



Titre: Couches minces organiques riches en amines primaires par photo-polymérisation ultraviolette : caractérisation et applications
Title: biomédicales

Auteur: Amélie St-Georges-Robillard
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: St-Georges-Robillard, A. (2012). Couches minces organiques riches en amines primaires par photo-polymérisation ultraviolette : caractérisation et applications biomédicales [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/975/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/975/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michael Wertheimer, & Sophie Lerouge
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

COUCHES MINCES ORGANIQUES RICHES EN AMINES PRIMAIRES PAR
PHOTO-POLYMÉRISATION ULTRAVIOLETTE : CARACTÉRISATION ET
APPLICATIONS BIOMÉDICALES

AMÉLIE ST-GEORGES-ROBILLARD

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

COUCHES MINCES ORGANIQUES RICHES EN AMINES PRIMAIRES PAR PHOTO-
POLYMÉRISATION ULTRAVIOLETTE : CARACTÉRISATION ET APPLICATIONS
BIOMÉDICALES

présenté par : ST-GEORGES-ROBILLARD Amélie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEBLOND Frédéric, Ph.D., président

M. WERTHEIMER Michael R., D.Sc.A., membre et directeur de recherche

Mme LEROUGE Sophie, Ph.D., membre et codirectrice de recherche

Mme HOEMANN Caroline, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Michel Wertheimer, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et supervisée tout au long de ma maîtrise. Merci d'avoir pris le temps nécessaire pour m'aider à me développer en tant que chercheuse. Merci pour les discussions intéressantes et merci de m'avoir poussée à me dépasser. Je tiens également à remercier ma co-directrice, Sophie Lerouge, de m'avoir permis de découvrir le côté biologique des choses et la différence de points de vue entre la physique et la biologie. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts au CRCHUM.

Je tiens à remercier Juan-Carlos, post-doctorant, puis associé de recherche du laboratoire, qui m'a appris les bases du dépôt de couches minces et leur caractérisation. Merci également à mes autres collègues de Poly, Angel, Houman et Bachir, pour les discussions fructueuses. Je veux aussi remercier Fackson Mwale de m'avoir permis d'effectuer plusieurs expériences de culture cellulaire dans son laboratoire et je remercie également toute son équipe, en particulier Alain, Hugh, Sonia, Padma et Guoying, pour leur aide avec ces expériences. Merci à tous les étudiants du LBeV pour leur aide et leur accueil chaleureux lors de mes expériences au CRCHUM.

Merci également à Suzie pour son aide avec les mesures XPS. Je veux aussi remercier Yves pour son aide technique rapide lors de ma maîtrise et Bruno, pour son aide essentielle et constante lors des expériences de culture cellulaire au CRCHUM.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire de Caroline Boudoux pour leur soutien social, avec qui j'ai passé de très bons dîners, parties de tennis et sorties au pub. Vous m'avez accueillie comme l'une des vôtres.

Je remercie également de tout cœur Benoît qui a su me soutenir moralement tout au long de ma maîtrise. Merci pour ton soutien inconditionnel et tes encouragements, merci de m'avoir poussée à aller plus loin. Merci également à mes parents qui me soutiennent depuis toujours et qui m'ont permis de me rendre où je suis maintenant.

Je voudrais terminer en soulignant le support financier reçu au cours de ma maîtrise par ces organismes subventionnaires : le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), le Groupe de recherche en sciences et technologies biomédicales (GRSTB) et le Centre de recherche du CHUM (CRCHUM).

RÉSUMÉ

Les biomatériaux ont grandement évolué au cours des dernières décennies. Il existe maintenant plusieurs types de biomatériaux polymériques possédant des caractéristiques physiques et mécaniques adaptées à différentes applications, mais dont la biocompatibilité doit être optimisée. Ce projet se concentre sur l'amélioration des propriétés physico-chimiques de la surface de ces matériaux en y incorporant des amines primaires ($R-NH_2$), un groupement fonctionnel reconnu pour favoriser l'adhésion et la croissance cellulaire, et ce, dans le cadre de deux applications biomédicales. Tout d'abord, on cherche à développer une surface de culture cellulaire permettant l'adhésion des monocytes U937. Ces cellules sont utilisées pour étudier l'effet des particules d'usure des prothèses de hanche dans le cadre de l'ostéolyse périprothétique, une des causes majeures de défaillance de ces prothèses. De plus, une des stratégies employées pour améliorer le taux de succès des prothèses vasculaires polymériques est la création d'une couche de cellules endothéliales sur la paroi interne de la prothèse. Pour ce faire, l'obtention d'une surface améliorant l'adhésion et la croissance des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) est nécessaire. Des études antérieures ont démontré que l'ajout de groupements $R-NH_2$ sur la surface de culture permet l'adhésion des monocytes U937, selon une concentration critique $[NH_2]_{crit}$, et améliore la prolifération des HUVEC.

Le dépôt de couches minces organiques par photo-polymérisation ultraviolette permet d'ajouter un revêtement riche en groupements $R-NH_2$, nommé UV-PE:N, sur un substrat. Le dépôt chimique en phase vapeur permet également de déposer une couche mince de parylène diX AM riche en $R-NH_2$. La stabilité physico-chimique de ces revêtements dans l'air et dans l'eau, essentielle pour les applications biomédicales, a tout d'abord été étudiée, en mesurant la perte d'épaisseur et la variation de la composition chimique de la surface, en particulier celle des amines primaires. Le vieillissement subit par le parylène diX AM en contact avec l'air ambiant est responsable d'une diminution de $[NH_2]/[C]$ d'environ 6 % sur 22 jours et est seulement causé par l'oxydation des groupements $R-NH_2$, tandis que dans le cas des deux types d'UV-PE:N $[NH_2]/[C]$ diminue de seulement 2,5 % sur 26 jours et un deuxième mécanisme est présent, soit la réaction des radicaux présents dans la surface avec cet oxygène, qu'il soit dans l'air ou dissout dans l'eau. L'UV-PE:N présente une insolubilité, malgré une haute concentration en azote, et une

excellente rétention des groupements R-NH₂ lorsqu'il est immergé dans l'eau, propriétés essentielles dans le cadre de culture cellulaire.

Ces travaux ont également permis d'établir que l'UV-PE:N, déposé à l'aide d'un ratio de gaz R valant 0,75, est une surface permettant l'adhésion et la survie des monocytes U937, sans provoquer de réaction inflammatoire majeure, permettant ainsi l'étude de l'effet des particules d'usure sur celles-ci. L'adhésion des monocytes sur le parylène diX AM présente un comportement différent : l'adhésion à court terme est proportionnelle à [NH₂], et non régulée par un seuil critique [NH₂]_{crit}, comme cela a été observé sur plusieurs types de revêtements déposés par plasma et ultraviolets, dont l'UV-PE :N. De plus, les cellules ne subsistent pas sur le parylène diX AM pendant 24 heures. Ces différences restent toujours à élucider.

Finalement, l'adhésion et la croissance des HUVEC sur deux types d'UV-PE:N ($R = 0,75$ et 1) sont supérieures à celles sur PET non traité et comparable au L-PPE:N (couche mince organique azotée déposée à basse pression par plasma, à base d'éthylène) et aux surfaces gélatinisées, conventionnellement utilisées en culture cellulaire. L'UV-PE:N est donc un revêtement prometteur qui offre une stabilité dans l'air et dans l'eau permettant son utilisation en culture cellulaire et qui a démontré sa performance pour deux applications biomédicales.

Mots clés : biomatériaux, amines primaires, dépôt de couches minces, photo-polymérisation, polymérisation plasma, XPS, dérivation chimique, ellipsométrie, adhésion cellulaire, arthroplastie, prothèse vasculaire.

ABSTRACT

Biomaterials have evolved significantly over the past decades. There are now several types of polymeric biomaterials with physical characteristics suited to different applications. This project focuses on improving the physico-chemical properties of the surface of these materials by incorporating primary amines (R-NH_2), a functional group known to promote adhesion and cell growth, in the context of two biomedical applications. First, it is necessary to develop a cell culture surface that enables the adhesion of U937 monocytes. These cells are used to evaluate the effect of wear particles produced by the prosthesis in periprosthetic osteolysis, a major cause of failure of a hip replacement. Second, one of the strategies used to improve the success rate of polymeric vascular grafts is to create a layer of endothelial cells on the lumen of the prosthesis. A coating that promotes the adhesion and growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is required to achieve that layer. Previous studies have demonstrated that the addition of R-NH_2 groups on the coating allows the adhesion of U937 monocytes, provided that their concentration $[\text{NH}_2]$ is higher than a certain critical value, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$; R-NH_2 groups were also found to enhance the adhesion and proliferation of HUVEC.

Two different primary amine-rich coatings are investigated in this work: organic thin films deposited by vacuum ultraviolet (VUV) photo-polymerization, UV-PE:N; and parylene diX AM, deposited by chemical vapor deposition (CVD). The physico-chemical stability of these coatings in air and in water, essential for biomedical applications, was first studied. “Aging” of parylene diX AM in contact with the ambient air caused a diminution of $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ of around 6 % during 22 days and is caused by the oxidation of R-NH_2 by atmospheric oxygen, while in the case of UV-PE:N, the diminution is only of 2,5 % over 26 days. Also, a second aging mechanism is present: the reaction of trapped free radicals in the coating with oxygen in air or dissolved in water. The UV-PE:N coating proved virtually insoluble, despite a high concentration of nitrogen and showed excellent retention of the R-NH_2 groups when immersed in water, two essential properties for applications in cell culture.

These studies have also shown that UV-PE:N coatings (deposited with two gas ratios, $\text{R} = 0.75$ and 1) permit adhesion and survival of U937 monocytes without causing any significant inflammatory response, which enables one to study wear particle effects. However, the adhesion of U937 monocytes on parylene diX AM manifests a rather different behavior, adhesion being

proportional to $[\text{NH}_2]$ and not controlled by the critical threshold, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, observed for different types of plasma-polymer coatings. Also, monocytes do not survive for 24 hours on parylene diX AM. The cause for these differences remains to be elucidated.

Finally, the adhesion and growth of HUVEC on both types of UV-PE:N ($R = 0.75$ and 1), as well as on L-PPE:N and on gelatinized polystyrene, were statistically higher than on untreated PET. Therefore, UV-PE:N has proven to be a cell culture surface well-adapted for HUVEC, of similar efficiency to gelatinized polystyrene, a surface known to promote the adhesion and growth of HUVEC. UV-PE: N is therefore a promising coating that provides stability in air and in water for use in cell culture and has demonstrated its performance for two biomedical applications.

Keywords: biomaterials, primary amines, thin film deposition, photo-polymerization, plasma polymerization, XPS, chemical derivatization, ellipsometry, cellular adhesion, arthroplasty, vascular graft.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
LISTE DES ANNEXES.....	XXIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Fonctionnalisation de surface.....	5
1.1.1 Polymérisation plasma	5
1.1.1.1 La physico-chimie des plasmas.....	5
1.1.1.2 Mécanisme de la polymérisation plasma	6
1.1.1.3 Structure des polymères-plasma.....	7
1.1.1.4 Composition chimique des polymères-plasma.....	8
1.1.2 Photochimie d'ultraviolets lointains	9
1.1.3 Modification de surfaces polymériques par plasma	10
1.1.4 Dépôt chimique en phase vapeur	11
1.2 Biomatériaux et leurs interactions avec les cellules.....	11
1.2.1 Amines primaires	14
1.2.2 Fabrication de surfaces riches en amines primaires	14
1.2.2.1 Polymérisation plasma	16
1.2.2.2 Photo-polymérisation ultraviolette.....	17

1.2.2.3	Modification de surface.....	17
1.2.2.4	Dépôt chimique en phase vapeur	18
1.3	Problématiques étudiées.....	18
1.3.1	Arthroplastie de la hanche.....	18
1.3.2	Médecine vasculaire.....	24
CHAPITRE 2	MÉTHODOLOGIE.....	27
2.1	Techniques de dépôt des différents revêtements.....	27
2.1.1	L-PPE:N	27
2.1.2	UV-PE:N	28
2.1.3	Parylène diX AM	31
2.2	Techniques de caractérisation	32
2.2.1	Spectroscopie des photoélectrons X.....	32
2.2.2	Dérivation chimique.....	37
2.2.3	Ellipsométrie	39
2.2.4	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel	41
2.3	Expériences	45
2.3.1	Stabilité des revêtements dans l'air	45
2.3.2	Stabilité des revêtements dans l'eau	45
2.3.3	Adhésion des monocytes U937	46
2.3.4	Expression génétique des monocytes U937	46
2.3.5	Adhésion et croissance des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)	48
CHAPITRE 3	ADHÉSION DES MONOCYTES U937 SUR DIFFÉRENTES SURFACES RICHES EN AMINES PRIMAIRES.....	50
3.1	Présentation de l'article.....	50

3.2	Adhesion of U-937 Monocytes on Different Amine-functionalised Polymer Surfaces	50
3.2.1	Abstract	51
3.2.2	Introduction	51
3.2.3	Experimental Part.....	54
3.2.3.1	Preparation and Characterisation of Amine-rich Coatings	54
3.2.3.2	Cell Culture and Adhesion Studies	56
3.2.3.3	Gene Expression Studies	57
3.2.4	Results	58
3.2.4.1	Aging of Parylene, L-PPE:N and UV-PE:N Films	58
3.2.4.2	Adhesion of U937 Monocytes on Parylene Films	62
3.2.4.3	Adhesion and Gene Expression of U937 Monocytes on UV-PE:N Films.....	65
3.2.5	Discussion and Conclusion	66
3.2.6	Acknowledgements	69
3.2.7	References	69
CHAPITRE 4	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	72
4.1	Stabilité des revêtements dans l'eau	72
4.2	Adhésion et croissance de cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)	76
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	78
5.1	Synthèse des principaux résultats.....	78
5.1.1	Caractérisation physico-chimique	78
5.1.2	Adhésion des monocytes U937	81
5.1.3	Adhésion et croissance des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)	83
5.2	Limitations et perspectives de l'UV-PE:N pour des applications biomédicales	84

5.3 Limitations et perspectives du projet	85
CONCLUSION	88
RÉFÉRENCES.....	90
ANNEXES	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Facteurs influençant le vieillissement d'un revêtement de surface. Adapté de [22].	15
Tableau 2.1: Paramètres utilisés pour le dépôt de L-PPE:N.	28
Tableau 2.2: Longueurs d'onde produites par chacune des lampes VUV	29
Tableau 2.3: Paramètres utilisés pour le dépôt de l'UV-PE:N.	31
Tableau 2.4: Séquence des gènes utilisés lors de la qRT-PCR [13].	47
Table 3.1: Summary of kinetic data (time-constants) and chemical composition of the different coatings.....	61
Tableau 4.1: Concentration de chlore avant et après 24 h d'immersion dans l'eau Milli-Q.....	76
Tableau 5.1: Comparaison du pourcentage d'adhésion des HUVEC après 4 h d'incubation.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Étapes de la formation d'un PP.....	7
Figure 1-2: Polymère classique de poly(éthylène) (PE) haute densité, adapté de [19].....	8
Figure 1-3: Structure hypothétique d'un PP d'éthylène [21].	8
Figure 1-4: Coefficients d'absorption k de l'ammoniac (NH_3) et de l'éthylène (C_2H_4) gazeux (axe de gauche) et pics d'émission de deux lampes VUV, au krypton (Kr) et au xénon (Xe) (axe de droite) en fonction de la longueur d'onde λ [26], reproduite avec permission.	10
Figure 1-5: Mécanisme d'adhésion général d'une cellule sur une surface via ses récepteurs et les ligands disponibles. Reproduite de la référence [35], avec l'autorisation de reproduction de Landes Bioscience.	13
Figure 1-6: Radiographie préopératoire de la hanche d'un patient avant une deuxième reprise de la chirurgie due au descellement aseptique. Les flèches dénotent des régions de résorption du tissu osseux [52], reproduite avec permission.	19
Figure 1-7: Démonstration de l'effet de $[\text{N}]_{\text{crit}}$ sur l'adhésion des monocytes U937. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure sur des films de H-PPE:N (PP déposé à pression atmosphérique à base d'éthylène riche en azote) où : A) $[\text{N}] = 25 \text{ at.}\%$, et B) $[\text{N}] = 23 \text{ at.}\%$ [9], reproduite avec permission.	21
Figure 1-8: Mesure de la concentration $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ nécessaire à l'adhésion des monocytes U937 sur différents revêtements. Les barres d'histogramme représentent $[\text{N}]_{\text{crit}}$ tandis que les points représentent $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$. L'absence de barre d'histogramme et de point pour le H-PPA:N indique qu'aucune adhésion n'a été observée, signifiant qu'aucun seuil critique d'adhésion n'a été observé. La valeur moyenne de $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ est représentée par la ligne horizontale pointillée et correspond à $4,2 \pm 0,5 \text{ at.}\%$ [9], reproduite avec permission.	22
Figure 1-9: Expression génétique des cytokines $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{Il-1}\beta$ par les monocytes U937. Ces derniers ont été cultivés jusqu'à 24 h en suspension (contrôle) (\square) et sur H-PPE:N (\circ) et L-PPE:N (\blacksquare), contenant $[\text{NH}_2] > [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences [9], reproduite avec permission.	24

- Figure 1-10: Cinétique d'adhésion des HUVEC sur PET, PET gélatiné, H-PPE:N (20 sccm, H20), H-PPE:N (50 sccm, H50), L-PPE:N ($R = 0,75$, L0.75), L-PPE:N ($R = 1$, L1) et PS gélatiné. Dans le cas du H-PPE:N, 20 et 50 sccm correspondent au débit de l'ammoniac dans le réacteur lors du dépôt. Le ratio R représente le ratio des gaz insérés dans le système de dépôt du L-PPE:N : $R \equiv F_{NH_3}/F_{C_2H_4}$. La différence entre les surfaces polymérisées par plasma et le PET est significative ($p < 0,05$) sauf pour L-PPE:N ($R = 1$) à 30 min [12], reproduite avec permission.26
- Figure 2-1: Schéma du système de dépôt par plasma r.f. à basse pression utilisé pour déposer un revêtement de L-PPE:N [64], reproduite avec permission.....28
- Figure 2-2: A): Schéma du système de dépôt par photo-polymérisation ultraviolette utilisé pour déposer l'UV-PE:N. B) Porte-échantillon de type « convoyeur » permettant de déposer le revêtement sur un ruban de 1 cm par 24 cm [13], reproduites avec permission.30
- Figure 2-3: A) Dimère du parylène diX AM contenant un groupement R-NH₂, où $m = n$ ([13], reproduite avec permission). B) Schéma du système de dépôt de parylène du FhIGB [66]..32
- Figure 2-4: Diagramme représentant l'émission d'un photoélectron K par l'absorption d'un photon X [70], reproduite avec permission.33
- Figure 2-5: Spectre XPS de type survol (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie MgK α) effectué sur un échantillon d'UV-PE:N de 200 nm sur c-Si, $R = 0,75$. On peut observer les différents pics d'énergie de liaison correspondants aux différents éléments (C, N et O). L'aire sous la courbe de chacun des pics est reliée à la concentration de l'élément.35
- Figure 2-6: Spectre XPS de haute résolution (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie MgK α) sur le pic correspondant à l'azote d'un échantillon de Parylène diX AM tel que déposé. La courbe de la partie supérieure du graphique représente l'erreur commise par la modélisation.36
- Figure 2-7: Spectre XPS de haute résolution (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie MgK α) sur le pic correspondant à l'azote d'un échantillon de Parylène diX AM en contact avec l'air ambiant pendant 22 jours. La courbe de la partie supérieure du graphique représente l'erreur commise par la modélisation.37

- Figure 2-8: Réaction de dérivation des groupements R-NH₂ avec le TFBA, ajoutant trois fluors par groupement R-NH₂ (illustré ici sur un film de PE traité par plasma) [74], reproduite avec permission.38
- Figure 2-9: Principe de fonctionnement de l'ellipsométrie [76], reproduite avec permission.40
- Figure 2-10: Tracé d'un faisceau lumineux dans un modèle représentant une couche mince (*coating*) déposée sur un substrat de verre (*glass*) [77], reproduite avec permission.40
- Figure 2-11: Principe de fonctionnement de l'amplification en chaîne par polymérase [79], reproduite avec permission.....43
- Figure 2-12: Courbe typique de PCR en temps réel. C_T/C_p représentent le cycle où la fluorescence est détectable, LP représente la phase linéaire logarithmique, TP représente la phase de transition et PP représente la phase plateau. Les courbes pointillées correspondent à des concentrations de plus en plus faible, résultant en une augmentation de la valeur du cycle seuil [81], reproduite avec permission.44
- Figure 3-1: Chemical structure of Parylene diX AM. Note that on average $n = m$53
- Figure 3-2: A): Schematic view of the reactor used for VUV-photo-polymerisation of thin coatings on a moving ribbon (see text); B) Conveyor-type sample holder in (A), used for applying a UV-PE:N coating on a 24 cm x 1 cm continuously-moving strip of polymer (Kapton[®] polyimide) (see text).55
- Figure 3-3: Time-evolutions of the composition of: A) Parylene diX AM; B) UV-PE:N ($R = 0.75$); and C) UV-PE:N ($R = 1$); as a function of the duration of storage in laboratory atmosphere in the dark. Open symbols represent $[O]/[C]$60
- Figure 3-4: Decrease in the adhesion of U937 cells on Parylene surfaces with a decrease in [NH₂] because of aging. U937 cells were applied on 1 cm² of Parylene surfaces and incubated for 1 h in a CO₂ incubator at 37 °C, on the pristine surface (A) – [NH₂] ~ 6.0 at.%), after 6 days (B) – [NH₂] ~ 3.5 at.%), and 10 days (C) – [NH₂] 2.5 at.%) of aging, resulting from exposure to atmospheric air in the dark. Surfaces were then gently washed with medium and pictures were taken. Cells on regular polystyrene Petri dish (D) served as negative control. Note the decrease in cell adhesion with decreasing [NH₂] resulting from the aging in laboratory air. E): Cell density of U937 on Parylene as a function of primary amine

- concentration, corresponding to A, B, and C above; values are normalized with respect to pristine Parylene ($\equiv 100\%$), image A. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$63
- Figure 3-5: Adhesion of U937 cells on Parylene diX AM films as a function of time in media. U937 cells were applied on $1\ \text{cm}^2$ Parylene surfaces and incubated for 1 h in CO_2 incubator at $37\ ^\circ\text{C}$. Surfaces were then washed with medium, and pictures were taken. A): Cells were incubated for 1 h on the pristine Parylene surface ($[\text{NH}_2] \sim 6.0\ \text{at.}\%$) (see also Figure 3-4A); B): cells were then cultured on the same surface for a total of 24 h, during which significant detachment of cells may be noted to have occurred. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$64
- Figure 3-6: Adhesion of U937 cells on UV-PE:N ($R = 0.75$) films as a function of time in media. U937 cells were applied on $1\ \text{cm}^2$ UV-PE:N surfaces and incubated for 1 h in CO_2 incubator at $37\ ^\circ\text{C}$. Surfaces were then washed with medium, and pictures were taken. A): Cells were incubated for 1 h on the UV-PE:N film ($[\text{NH}_2] \sim 4.5\ \text{at.}\%$); B): cells were then cultured on the same surface for a total of 24 h, during which retention of cells evidently persisted, contrary to the case of Parylene (see Figure 3-5). Scale bar: $10\ \mu\text{m}$65
- Figure 3-7: Expression of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{Il-1}\beta$ by U937 cells adhering on UV-PE:N with $[\text{NH}_2] > [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, in comparison with those adhering to L-PPE:N [9]. Ratios were calculated using equation (3.2). No major inflammatory reaction was induced by adhesion to UV-PE:N.66
- Figure 3-8: Plot of the electrostatic surface potential of humid Parylene as a function of primary amine concentration on pristine and aged samples.68
- Figure 4-1: Évolution temporelle de l'épaisseur et de la composition ($[\text{N}]$, $[\text{NH}_2]$ et $[\text{O}]$) de l'UV-PE:N, $R = 0,75$ (A) et $R = 1$ (B) en fonction du temps d'immersion dans l'eau Milli-Q, dans l'obscurité ($n = 2$).74
- Figure 4-2: Composition ($[\text{N}]$, $[\text{NH}_2]$ et $[\text{O}]$) de 4 ratios d'UV-PE:N déposés sur porte-échantillon fixe avant (I) et après (W) immersion pendant 20 h dans l'eau Milli-Q. La perte d'épaisseur (*loss of thickness*) durant cette période est également présentée. À la droite du graphique est présentée la composition d'un échantillon de PET traité par plasma NH_3 pendant 15 min avant (I) et après (W) 2 h d'immersion dans l'eau Milli-Q [14], reproduite avec permission.75

Figure 4-3: Adhésion pendant 4 h et croissance pendant 1, 4 ou 6 j des HUVEC sur PS gélaliné; PET; L-PPE:N R = 0,75; et UV-PE:N R = 0,75 et R = 1. Les résultats sur PET sont statistiquement inférieurs (* $p < 0,05$) aux résultats obtenus sur les autres surfaces en comparant les temps correspondants.77

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Allylamine, $C_3H_5NH_2$
AC	Courant alternatif, <i>alternative current</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
at. %	Pour 100 atomes mesurés au XPS
BOPP	Poly(propylène) orienté biaxialement, <i>biaxially-oriented poly(propylene)</i>
CCP	Plasma à couplage capacitif
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
COOH	Groupeement carboxyle
C_p	Cycle seuil de la PCR en temps réel, identique à C_T
CRCHUM	Centre de recherche du CHUM
CS	Chondroïtine-4-sulfate
c-Si	Gaufre de silicium cristallin
C_T	Cycle seuil de la PCR en temps réel, identique à C_p
CVD	Dépôt chimique en phase vapeur (<i>chemical vapor deposition</i>)
Δ	Différence de phase entre E_{rs} et E_{rp}
DACH	1,2-diaminocyclohexane, $C_6H_{10}(NH_2)_2$
DACRON	Poly(éthylène téréphtalate) tissé
DC	Courant continu, <i>direct current</i>
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
diX A	Type de parylène avec amines primaires

diX AM	Type de parylène avec amines primaires : aminomethyl-[2-2]paracyclophane
DMEM	Milieu Eagle modifié par Dulbecco, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	voir ADN
\vec{E}	Champ électrique d'une onde électromagnétique
E_b	Énergie de liaison, <i>binding energy</i>
EEDF	Fonction de distribution en énergie des électrons, <i>electron energy distribution function</i>
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
Egr-1	Protéine de réponse de croissance précoce 1, <i>early growth response protein 1</i>
E_{ip} et E_{is}	Composantes du champ électrique incident
E_k	Énergie cinétique, <i>kinetic energy</i>
ePTFE	Poly(tétrafluoroéthylène) expansé
E_{rs} et E_{rp}	Composantes du champ électrique réfléchi
ESCA	Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique, <i>electron spectroscopy for chemical analysis</i>
ESR	Résonance électron-spin, <i>electron-spin resonance</i>
FBS	Sérum de veau fœtal, <i>fetal bovine serum</i>
FhIGB	Institut Fraunhofer du génie des interfaces et biotechnologie, <i>Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology</i>
F_X	Débit du gaz X
GAPDH	Gène de référence pour la qRT-PCR
HA	Heptylamine, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$
$h\nu$	Énergie d'un photo
H-PPA:N	Polymère-plasma déposé à pression atmosphérique à base d'acétylène riche en azote, <i>High-pressure Plasma-Polymerized Acetylene rich in Nitrogen</i>

H-PPE:N	Polymère-plasma déposé à pression atmosphérique à base d'éthylène riche en azote, <i>High-pressure Plasma-Polymerized Ethylene rich in Nitrogen</i>
HUVEC	Lignée cellulaire de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
I	Concentration ou épaisseur initiale
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL-1 β	Interleukine 1 β
k	Coefficient d'extinction
LMWOM	Matériaux oxydés de faible poids moléculaire, <i>Low Molecular Weight Oxidized Materials</i>
L-PPE:N	Polymère-plasma déposé à basse pression à base d'éthylène riche en azote, <i>Low-pressure Plasma-Polymerized Ethylene rich in Nitrogen</i>
n	Indice de réfraction
OH	Groupement hydroxyle
p	Polarisation parallèle
p	Valeur de p dans un test statistique
p	Pression interne du réacteur lors d'un dépôt
P	Puissance du plasma
ϕ	Fonction caractéristique de l'appareil XPS
ψ	Différence d'amplitude entre E_{rs} et E_{rp}
PBS	Tampon phosphate salin, <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Polycarbonate
PC12	Lignée cellulaire de phéochromocytome de rat
PCR	voir RT-PCR
PE	Poly(éthylène)

PECVD	Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma
PET	Poly(éthylène téréphtalate)
PP	Polymères-plasma
PP	Poly(propylène)
PPAR γ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes, type γ , <i>peroxisome proliferator-activated receptor, γ type</i>
PS	Poly(styrène)
PSMAA	Polystyrène- <i>co</i> -maleicanhydride
PTFE	Poly(tétrafluoroéthylène)
PU.1	Facteur de transcription PU.1
PVP:N	<i>Plasma- or VUV-Polymerized N-rich materials</i>
QCM-D	Micro-balance à cristal de quartz avec module de dissipation, <i>quartz crystal micro-balance with dissipation monitoring</i>
qPCR	PCR quantitative
qRT-PCR	PCR, après transcription inverse, en temps réel
<i>R</i>	Ratio des débits de gaz
RCRA	Registre canadien des remplacements articulaires
r.f.	Radiofréquence
RNA	voir ARN
R-NH ₂	Groupeement d'amine primaire
RT-PCR	Amplification en chaîne par polymérisation après transcription inverse, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s	Polarisation perpendiculaire
S.E.	Ellipsométrie spectroscopique (<i>spectroscopic ellipsometry</i>)
Si	Silicium

SYBR Green I	Fluorophore vert utilisé en qPCR
τ	Constante de temps
Taq	Polymérase thermorésistante
TFBA	4-(Trifluorométhyl)benzaldehyde
TCPS	Poly(styrène) pour culture cellulaire, <i>Tissue-culture poly(styrene)</i>
THP-1	Lignée cellulaire de monocytes humains leucémiques
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α , <i>tumor necrosis factor-α</i>
U937	Lignée cellulaire de monocytes humains
UV-PE:N	Polymère-plasma déposé par photo-polymérisation ultraviolette à basse pression à base d'éthylène riche en azote, <i>UltraViolets-Polymerized Ethylene rich in Nitrogen</i>
V_B	Potentiel d'autopolarisation
VUV	Ultraviolets lointains, <i>vacuum ultraviolets</i>
VUV-PE:N	Identique à UV-PE:N. Polymère-plasma déposé par ultraviolets à basse pression à base d'éthylène riche en azote, <i>Vacuum UltraViolets-Polymerized Ethylene rich in Nitrogen</i>
VUV-PM:N	Polymère-plasma déposé par ultraviolets à basse pression à base de méthane riche en azote, <i>Vacuum UltraViolets-Polymerized Methane rich in Nitrogen</i>
W	Concentration ou épaisseur après immersion dans une solution
[X]	Concentration de l'espèce X
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X, <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1	FABRICATION AND CHARACTERISATION OF AMINE-RICH ORGANIC THIN FILMS: FOCUS ON STABILITY	100
ANNEXE 2	AMINE-RICH ORGANIC THIN FILMS FOR CELL CULTURE: POSSIBLE ELECTROSTATIC EFFECTS IN CELL-SURFACE INTERACTIONS.....	118

INTRODUCTION

Les polymères synthétiques sont utilisés dans le domaine biomédical depuis longtemps, et ceci, pour de nombreuses applications. Par exemple, le premier article scientifique sur l'utilisation du polyéthylène comme implant synthétique a été publié par Ingraham *et al.* en 1947 [1]. Depuis, les biomatériaux polymériques ont grandement évolué et sont utilisés dans une multitude d'applications, telles que les implants et les organes artificiels. Un biomatériau est matériel, naturel ou non, biocompatible avec l'organisme humain ou animal. Les biomatériaux sont également largement utilisés en recherche biologique et médicale comme surface de culture cellulaire, pour le dosage de protéines, pour la fabrication de laboratoires sur puces, etc. [2]. Il existe maintenant plusieurs types de polymères synthétiques possédant des caractéristiques mécaniques et physiques adaptées à différentes applications. Toutefois, il n'y a pas que ces propriétés générales qui sont importantes pour la performance d'un biomatériau; ses propriétés surfaciques le sont également, puisque ce sont les surfaces du biomatériau qui sont en contact direct avec le milieu biologique et déterminent la réponse biologique de ce milieu. L'idée est donc de conserver les propriétés générales (par exemple, mécaniques) du biomatériau tout en modifiant seulement sa surface afin de contrôler précisément les interactions biologiques [3]. Il existe ainsi un domaine d'étude spécialisé dans le développement de surfaces de plus en plus performantes pour le domaine biomédical. Plusieurs techniques sont disponibles pour modifier les propriétés de surfaces d'un matériau, telles que la modification par plasma ou rayonnement ultraviolet, le dépôt de couches minces, le greffage de biomolécules, etc.

Ce projet se concentre sur la modification de surfaces polymériques par dépôt de couches minces riches en amines primaires (R-NH_2). Ce groupement fonctionnel est connu pour sa capacité d'améliorer l'adhésion et la prolifération de cellules cultivées sur une surface qui contient une suffisamment grande concentration [4]. Dans un milieu aqueux à pH physiologique (7,4), les groupements R-NH_2 forment NH_3^+ ; les charges positives attirent ensuite les protéines portant des charges négatives contenues dans le milieu de culture de sorte qu'une couche de protéines se crée sur la surface, permettant l'adhésion subséquente de cellules [5]. Il existe plusieurs façons de déposer une couche mince riche en R-NH_2 . Trois techniques seront discutées dans ce mémoire : la photo-polymérisation ultraviolette, le dépôt de couches minces organiques par plasma (PECVD) et le dépôt chimique en phase vapeur (CVD).

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre de recherches en médecines orthopédique et vasculaire. La première application concerne l'arthroplastie de la hanche, une opération visant à remplacer cette articulation par une prothèse artificielle lorsqu'elle devient trop endommagée. Une des causes majeures de défaillance de cette prothèse est l'ostéolyse périprothétique, une dégradation de l'os autour de la prothèse menant au descellement aseptique [6]. Ce problème serait relié à la réaction du système immunitaire du corps humain face aux particules d'usure qui se créent lors du frottement entre deux parties mobiles de l'articulation [7]. Il est donc nécessaire d'étudier l'effet de ces particules dans des simulations en laboratoire. Toutefois, cette étude est complexe à effectuer parce que les monocytes U937 (cellules impliquées dans les réactions immunitaires) n'adhèrent pas aux surfaces de culture *in vitro* couramment utilisées. Elles demeurent en suspension alors que les particules d'usure sédimentent au fond de la culture cellulaire [8]. C'est pourquoi le développement d'une surface permettant l'adhésion de cette lignée cellulaire est important. Des études antérieures effectuées dans ce laboratoire indiquent qu'une concentration de groupements R-NH₂ supérieure à 4,2 at.% sur la surface de culture permet l'adhésion des monocytes U937 [9].

La deuxième application concerne l'amélioration de prothèses vasculaires synthétiques utilisées pour remplacer un vaisseau sanguin défectueux afin de rétablir un débit sanguin normal. L'utilisation d'une prothèse purement polymérique est toutefois une cause de défaillance par thrombogénèse, spécialement dans le cas d'un remplacement de vaisseau de petit diamètre [10]. Une des stratégies employées pour améliorer le succès des prothèses vasculaires est la création d'une couche de cellules endothéliales sur leur paroi interne (lumen). Cette couche de cellules est présente dans les vaisseaux sanguins naturels et sert de barrière entre le sang et la paroi, permettant de contrôler la thrombogénicité, l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et la prolifération des cellules musculaires lisses [11]. Pour créer cette couche endothéliale sur une prothèse, une technique à une seule étape, où des cellules endothéliales sont prélevées du patient et inoculées directement sur la prothèse, serait idéale. Cette technique nécessite cependant une excellente efficacité d'adhésion et de prolifération des cellules endothéliales. Pour ce faire, des études antérieures ont démontré que l'ajout de groupements R-NH₂ sur une surface polymérique favorise l'adhésion et la prolifération de ces cellules endothéliales [12].

Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer le potentiel d'un type de couche mince organique déposée par photo-polymérisation ultraviolette à basse pression, un matériau à base d'éthylène riche en amines primaires (UV-PE:N), dans les domaines de médecine orthopédique ou vasculaire. Ces travaux se feront tout en comparant sa performance à celle du parylène diX AM, un polymère commercial déposé par dépôt chimique en phase vapeur et contenant, lui aussi, des groupements R-NH₂ ainsi qu'en référence aux travaux antérieurs sur des revêtements similaires déposés par plasma à basse pression (L-PPE:N).

Étant donné l'importance de la concentration d'amines primaires et de la stabilité physico-chimique des surfaces, l'un des objectifs spécifiques est d'effectuer la caractérisation des revêtements UV-PE:N et parylène diX AM afin de connaître leur comportement au contact de l'air ambiant et d'un milieu aqueux. Ensuite, l'adhésion des monocytes U937 sur ces revêtements ainsi que leur expression génétique reliée à l'inflammation est évaluée. Finalement, l'étude de l'adhésion et la croissance de la lignée cellulaire de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) est effectuée sur les revêtements, comme première étape de l'évaluation de ces revêtements pour l'endothélialisation des prothèses vasculaires.

Organisation générale du mémoire

Le présent mémoire rapporte les travaux effectués dans le cadre d'une maîtrise (M.Sc.A.) en génie biomédical à l'École Polytechnique de Montréal, sous la direction des Professeurs Michel Wertheimer, du département de génie physique de l'École Polytechnique et Sophie Lerouge, du département de génie mécanique de l'École de Technologie Supérieure et du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

Le chapitre 1 présente une revue de littérature énonçant les principes théoriques nécessaires à la compréhension du mémoire. Les différentes techniques de fonctionnalisation de surface y sont développées. Les amines primaires, ainsi que les différentes techniques permettant de les incorporer à la surface d'un biomatériau sont présentées. Finalement, les deux applications biomédicales de ce projet et les études antérieures qui y sont reliées sont également détaillées.

La méthodologie est par la suite présentée au chapitre 2. Une description de la théorie à la base des différentes techniques de caractérisation utilisées au cours de ce projet est d'abord

présentée, suivie du détail des conditions expérimentales pour chacune des expériences effectuées.

Le chapitre 3 présente un article scientifique produit au cours de ce projet et publié dans la revue *Plasma Processes and Polymers* [13]. Il porte plus spécifiquement sur l'application concernant l'adhésion des monocytes U937 et contient, entre autres, les détails méthodologiques ainsi que les résultats de la majorité des expériences. Le chapitre 4, quant à lui, présente des résultats complémentaires qui ne sont pas inclus dans l'article scientifique.

Le chapitre 5 contient une discussion générale de tous les résultats du projet. Cette discussion se veut différente de celle déjà exposée dans l'article scientifique au chapitre 3. Finalement, les limites et perspectives du projet sont détaillées.

En annexe sont présentés deux articles scientifiques auxquels j'ai participé en tant que deuxième auteure. Le premier de Ruiz *et al.* [14] présente une étude de la stabilité dans l'air et dans l'eau de plusieurs des revêtements mentionnés dans ce mémoire. Le deuxième article de Wertheimer *et al.* [15] concerne l'étude de l'interaction électrostatique entre les cellules, les protéines et les revêtements possédant une charge non nulle.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Fonctionnalisation de surface

1.1.1 Polymérisation plasma

1.1.1.1 La physico-chimie des plasmas

Le mot plasma désigne un gaz partiellement ou complètement ionisé, composé d'espèces neutres (atomes, molécules) et d'espèces chargées (électrons, ions). Irving Langmuir est le premier à avoir utilisé ce nom pour désigner ce qu'on appelle aussi le quatrième état de la matière, en plus de solide, liquide et gaz [16]. Il existe deux grands types de plasmas : les plasmas chauds et les plasmas froids. Les premiers sont des plasmas où l'équilibre thermique est atteint pour toutes les particules. Leur température est très élevée. Les plasmas chauds typiques sont présents dans les réacteurs à fusion, le cœur solaire, les arcs au plasma, etc. Dans ce projet, seuls les plasmas du type froid seront utilisés.

Les plasmas froids sont des plasmas qui n'ont pas atteint l'équilibre thermodynamique et dont la température des particules lourdes est proche de la température ambiante. Les plasmas froids typiques sont les aurores, les flammes, les décharges AC (courant alternatif) et DC (courant continu, *direct current*) à basse pression, les tubes fluorescents, etc. Ces plasmas sont dits « froids » parce que seulement les électrons atteignent une température suffisante pour provoquer l'ionisation. Les particules lourdes demeurent à une relativement basse température. Les particules neutres et les ions ayant une beaucoup plus grande masse que les électrons, la température globale du plasma demeure donc faible. Les paramètres typiquement utilisés pour décrire les plasmas sont présentés en détail dans le livre de Lieberman et Lichtenberg sur les principes des décharges plasma et le traitement des matériaux [17].

La création d'un plasma se base généralement sur l'une des trois sources d'énergie suivantes : radiation d'énergie élevée, champ électrique élevé ou température élevée [18]. Dans ce projet, l'énergie électrique radio-fréquentielle est utilisée pour créer un plasma à couplage capacitif (CCP). Ce dernier est l'un des types les plus communs de plasmas industriels. Le système est constitué de deux électrodes séparées d'une distance fixe dans un réacteur où un débit de gaz est maintenu à une pression réduite déterminée. Le plasma est généré par une source

électrique à radiofréquence (r.f.), généralement à 13,56 MHz (bande de fréquence « ISM »). Cette source est reliée à l'une des deux électrodes, la deuxième étant mise à la terre.

Un champ électrique élevé est alors généré entre les deux électrodes. Quelques électrons libres contenus dans le gaz sont accélérés par ce champ et ionisent des atomes ou molécules du gaz par des collisions inélastiques, produisant ainsi des électrons secondaires. Ces derniers sont à leur tour accélérés par le champ et ionisent d'autres atomes ou molécules. Lorsque le champ électrique est suffisant, un effet d'avalanche se produit jusqu'à l'atteinte d'une concentration d'équilibre des électrons, n_e , et le gaz devient un plasma [18].

La polymérisation plasma est un processus par lequel une couche mince de simili-polymère (un matériel différent d'un polymère typique) est déposée sur un substrat à l'aide d'un plasma. Dans ce dernier, les espèces hautement réactives provenant d'un ou plusieurs gaz « monomères » (molécules précurseurs) se condensent en simili-polymère (composé organique de poids moléculaire élevé) sur le substrat. Cette technique, impliquant l'utilisation du plasma, est très différente de la polymérisation dite "classique" : cette dernière produit un polymère composé d'unités de base (« mers ») se répétant en longues chaînes, tandis que les simili-polymères (dorénavant « polymères-plasma », PP) impliquent des processus hautement aléatoires créant ainsi des chaînes plus courtes et plus réticulées, où il n'existe pas d'unité répétitive simple. L'épaisseur du PP peut varier de quelques nanomètres à plusieurs micromètres, dictée par la durée et la vitesse de dépôt, et il adhère à une multitude de types de substrats solides (polymère, verre, métaux) [19] .

1.1.1.2 Mécanisme de la polymérisation plasma

Le mécanisme de la polymérisation plasma est décrit de façon simplifiée à la Figure 1-1. Tout d'abord, le monomère, c'est-à-dire les molécules organiques (ou mélange de gaz) précurseurs, est introduit dans le réacteur plasma. Par des collisions avec des électrons chauds ou avec des espèces excitées provenant du plasma (ions, photons, radicaux), les précurseurs sont excités ou dissociés en fragments (bris de liaisons chimiques). Les conditions choisies pour générer le plasma déterminent la nature et la concentration de ces fragments. L'énergie nécessaire pour briser les liaisons chimiques typiquement présentes dans les monomères et autres précurseurs est inférieure à l'énergie d'ionisation (> 10 eV) de ces molécules. De plus, l'énergie cinétique (« température ») de toutes les espèces présentes dans le plasma sauf les électrons est de

beaucoup inférieure à 10 eV. Les espèces créées par la fragmentation du plasma sont donc en majorité des radicaux neutres de tailles diverses. Ces radicaux peuvent, par la suite, entrer en collision avec d'autres fragments pour se recombinaison entre eux et former des liaisons covalentes avec ces espèces neutres pour générer des fragments de poids moléculaire de plus en plus élevé. Ces derniers vont ensuite se déposer sur le substrat par plasma-polymérisation, telle que décrite par Yasuda [20]. Brièvement, la croissance de ces macromolécules se fait sur le substrat via une suite de combinaisons non spécifiques des espèces présentes dans le plasma. Durant ce processus, une certaine fraction de radicaux ne se recombine pas avec d'autres espèces et crée une concentration non nulle de radicaux libres piégés dans le matériau déposé. Le matériau résultant du dépôt est donc composé de macromolécules, fortement réticulées, comprenant une certaine concentration de radicaux libres. Ces derniers sont en partie la cause du « vieillissement » du matériau, c'est-à-dire un changement de la composition chimique lorsque le dépôt est exposé à l'air ambiant et que ses radicaux libres réagissent avec l'oxygène de l'air (voir section 1.2.2) [19].

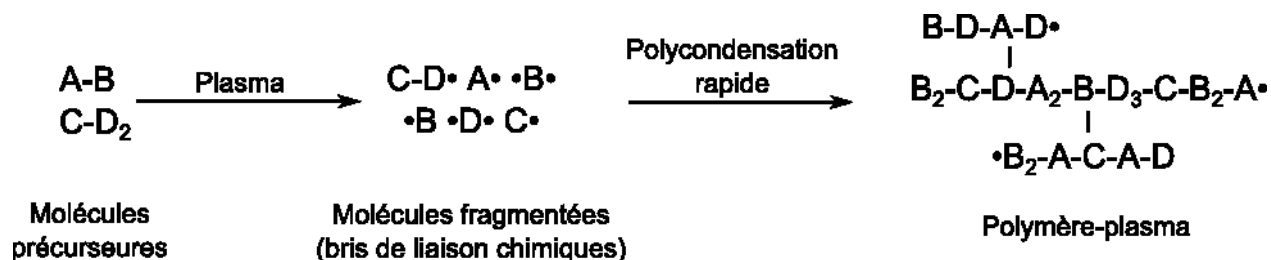


Figure 1-1: Étapes de la formation d'un PP.

1.1.1.3 Structure des polymères-plasma

La structure d'un matériau créé par plasma-polymérisation est donc très différente d'un matériau créé par polymérisation classique. En raison des processus aléatoires qui ont lieu dans le plasma, il est difficile, sinon impossible, de prévoir la structure du matériau en résultant. Il est donc nécessaire de le caractériser extensivement pour connaître sa structure et sa composition, contrairement au cas des polymères classiques : la structure de ces derniers est généralement représentative des monomères utilisés et constituée d'unités se répétant en chaîne, tel qu'illustré à la Figure 1-2 pour le cas d'un polymère aliphatique. Quant aux PP, ils sont composés de multiples courtes chaînes réticulées pouvant comporter des insaturations et même des cycles aromatiques (voir Figure 1-3) [19].

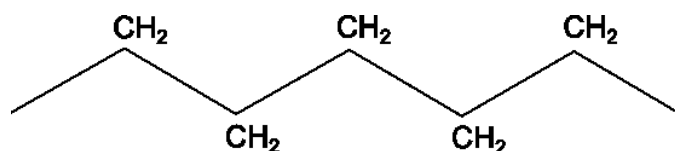


Figure 1-2: Polymère classique de poly(éthylène) (PE) haute densité, adapté de [19].

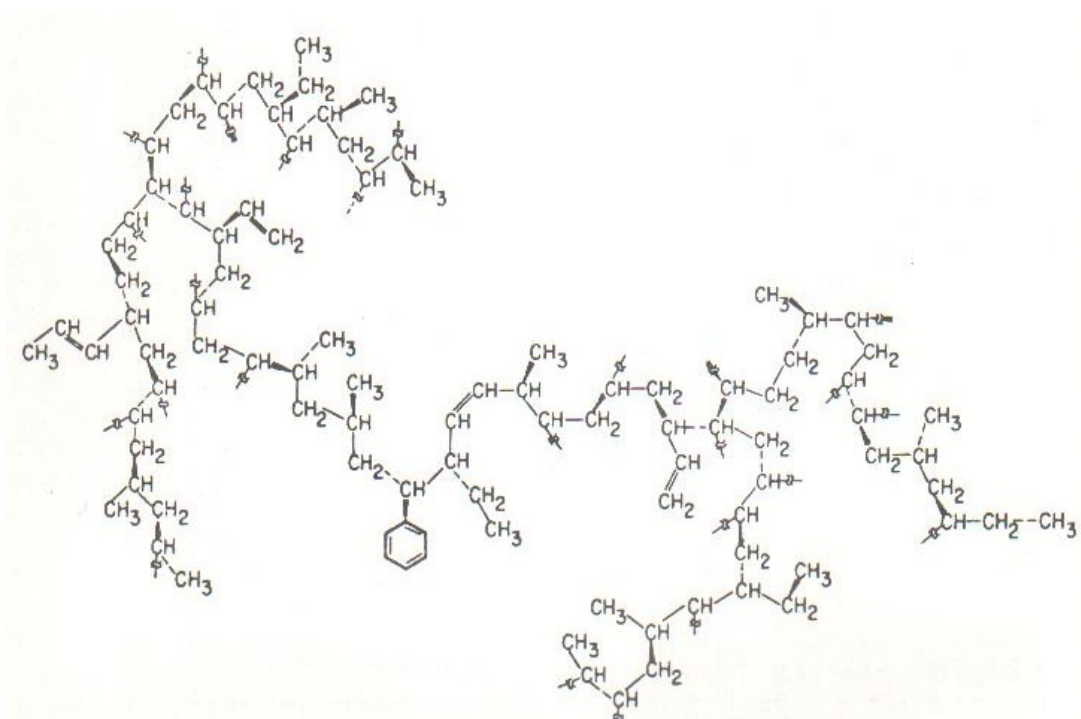


Figure 1-3: Structure hypothétique d'un PP d'éthylène [21].

1.1.1.4 Composition chimique des polymères-plasma

La nature des molécules introduites dans le réacteur détermine la composition chimique ainsi que les groupements fonctionnels qui apparaîtront dans le revêtement. Les molécules peuvent être amenées dans le réacteur sous forme d'un seul ou plusieurs composés gazeux ou par la vaporisation d'un liquide. Contrairement à la polymérisation classique, où le groupement fonctionnel voulu doit être présent dans la molécule précurseure, la polymérisation plasma peut être assez flexible quant au choix des molécules précurseures. Le choix du ou des gaz/liquides précurseurs se fait donc selon les éléments chimiques voulus et dans certaines situations, les groupements fonctionnels voulus. Si, par exemple, un revêtement contenant des groupements carboxyles (COOH) est désiré, il est possible d'utiliser la vapeur d'acide acrylique ($\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$) comme précurseur [22]. Il est à noter cependant que, selon les conditions de

dépôt, il est probable que les groupements fonctionnels COOH soient fragmentés dans le plasma. C'est pourquoi une des stratégies employées fréquemment consiste à choisir un mélange de gaz contenant ensemble les éléments requis pour former les fonctionnalités voulues. Par exemple, il est possible d'inclure dans le dépôt le même groupement carboxyle en utilisant deux gaz précurseurs, l'éthylène (C_2H_4), qui sert de base pour la polymérisation, et l'oxygène dilué dans l'argon à 10 % (O_2 -Ar), le CO_2 ou une autre source d'oxygène qui fournit l'oxygène nécessaire à la formation des groupements COOH. L'avantage de cette dernière méthode est qu'il est possible de varier la concentration de chacun des gaz indépendamment, permettant de changer la concentration relative des espèces dans le plasma. Cette flexibilité quant à la nature des gaz précurseurs permet l'utilisation de précurseurs possiblement moins coûteux et moins toxiques [23].

1.1.2 Photochimie d'ultraviolets lointains

Une deuxième approche émergente pour fonctionnaliser une surface polymère consiste à utiliser la photochimie produite par des photons ultraviolets lointains (VUV, *vacuum ultraviolet*) pour modifier la surface ou polymériser une couche mince sur la surface. Dans ce projet, la création de couches minces de simili-polymère par photochimie VUV est étudiée plus en profondeur. Cette technique se base sur des mécanismes très similaires à la polymérisation plasma. La principale différence provient de la façon dont l'énergie est transmise aux molécules précurseurs présentes dans le réacteur, lui aussi sous vide partiel. Dans le cas de la polymérisation-plasma, l'énergie provient surtout des électrons chauds possédant une large distribution EEDF (fonction de distribution en énergie des électrons, *electron energy distribution function*) pseudo-maxwellienne; par contre, dans le cas de la polymérisation par photochimie VUV, l'énergie provient de photons émis par une lampe avec un spectre d'émission précis. Par exemple, la lampe au krypton (Resonance, Ltd, Barrie, Canada) utilisée au cours de ce projet possède deux pics d'émission, à 116,5 nm et 123,6 nm, ce dernier étant de loin le plus intense. Comme nous le verrons, ce pic quasi-monochromatique permet d'obtenir des réactions plus spécifiques et sélectives durant le dépôt. En effet, tel que présenté à la Figure 1-4, l'ammoniac (NH_3) absorbe les photons à 123,6 nm, ce qui scinde la molécule de NH_3 en radicaux $-NH_2$ et $-NH$ et en hydrogène. Ces radicaux n'absorbent pas les photons à 123,6 nm, ce qui est idéal pour le dépôt de revêtements riches en amines primaires ($R-NH_2$), étant donné que les radicaux

d'amines primaires ne seront pas dissociés à nouveau avant de se polymériser sur un substrat [24]. L'éthylène (C_2H_4) est également absorbent également ces photons provoque la formation d'acétylène (C_2H_2) selon les deux processus suivants [25] :

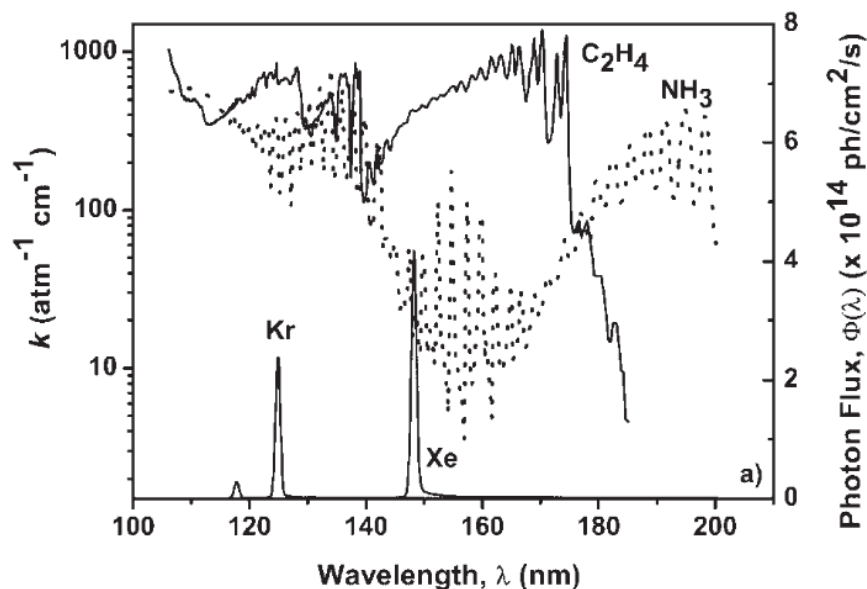
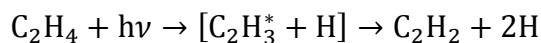
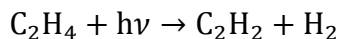


Figure 1-4: Coefficients d'absorption k de l'ammoniac (NH_3) et de l'éthylène (C_2H_4) gazeux (axe de gauche) et pics d'émission de deux lampes VUV, au krypton (Kr) et au xénon (Xe) (axe de droite) en fonction de la longueur d'onde λ [26], reproduite avec permission.

1.1.3 Modification de surfaces polymériques par plasma

Une autre approche pour fonctionnaliser une surface polymérique consiste à modifier sa structure chimique à l'aide d'un plasma. Quatre effets majeurs sont observés à différents degrés lors de l'interaction entre un plasma qui ne crée pas de dépôt et une surface organique : (i) le nettoyage de la surface de la contamination organique ou de molécules d'eau, (ii) l'ablation de matériel de la surface, (iii) la réticulation d'une couche près de la surface et (iv) la modification de la composition chimique de la surface. En utilisant les gaz et les paramètres de plasma appropriés, il est possible de favoriser le quatrième effet. La principale différence entre cette technique et la polymérisation plasma est que ce traitement par modification n'ajoute pas de nouvelle matière sur la surface : elle ne fait que modifier la composition et la structure de

quelques couches moléculaires (dizaines de nanomètres) de la surface du matériau par le plasma. Cependant, cette approche permet d'ajouter à la surface une multitude de différents groupements fonctionnels, selon la nature du ou des gaz utilisés [27]. Par contre, un inconvénient de cette approche est que la quantité de groupements qu'il est possible d'incorporer à la surface est souvent limitée par rapport à la polymérisation plasma. L'oxydation des polyoléfinés (un type de polymère) par un traitement corona dans l'air provoque la formation de matériaux oxydés de faible poids moléculaire (LMWOM) qui disparaîtront de la surface après un lavage avec un liquide polaire comme l'eau. De plus, la réorganisation hydrophobe (*hydrophobic recovery*), phénomène fondamental d'origine thermodynamique, fait en sorte que les groupements polaires à la surface du matériau ont tendance à s'enfouir dans celui-ci, diminuant ainsi la concentration surfacique de ces groupements [28].

1.1.4 Dépôt chimique en phase vapeur

Le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) est une technique permettant de déposer une multitude de types de couches minces comme des métaux ou des polymères [29]. La technique générale se base sur l'introduction d'un ou plusieurs gaz réactifs précurseurs dans une chambre de dépôt contenant un substrat. Plus précisément, pour le dépôt de polymères, le précurseur, sous forme solide ou liquide, est introduit dans une première chambre du réacteur et est sublimé ou évaporé, respectivement. La vapeur résultante est transférée dans la chambre de dépôt où le substrat est placé. Les espèces présentes dans la vapeur s'adsorbent (se condensent) sur le substrat où elles vont former un nouvel îlot, se greffer à un îlot existant ou retourner sous forme gazeuse. Lorsque suffisamment d'espèces se condensent, une couche mince est créée. Le taux de dépôt dépend de la rapidité de déplacement de la vapeur de précurseurs vers la chambre de dépôt et du taux de condensation de cette vapeur. Si un plasma est présent dans la chambre de dépôt pour participer à la polymérisation sur le substrat, cette technique est nommée dépôt chimique en phase vapeur assistée par plasma (PECVD), correspondant à la polymérisation plasma décrite à la section 1.1.1 [29].

1.2 Biomatériaux et leurs interactions avec les cellules

La définition d'un biomatériau est un matériau non viable utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec des systèmes biologiques [2]. Les biomatériaux sont grandement utilisés

dans le domaine médical, comme dans les implants, les organes artificiels, les systèmes de livraison de médicaments, etc. Ils sont également très utilisés dans la recherche biologique et médicale comme surface de culture cellulaire, pour le dosage de protéines en laboratoire et pour fabriquer les laboratoires sur puces [2]. Dans le cadre de culture cellulaire avec milieu de culture avec sérum, ou lors de l'interaction avec le corps humain, l'adhésion, la prolifération, la différenciation, etc. d'une cellule sur une surface se font via l'interaction entre la surface, les biomolécules présentes (par exemple, un milieu de culture avec sérum contient, entre autres, des protéines, des polysaccharides, des lipides, des sels, de l'urée et des glucides) et, enfin, la cellule. Lorsqu'une suspension de cellules dans leur milieu de culture est déposée sur un biomatériau, les protéines contenues dans le milieu de culture couvrent rapidement la surface de celui-ci. La nature de la couche de protéines adsorbées est déterminée par les propriétés chimiques (groupements fonctionnels précis) mécaniques et morphologiques de la surface du biomatériau [30]. Les cellules possèdent une multitude de récepteurs à leur surface, récepteurs capables de reconnaître spécifiquement les protéines. Les cellules vont donc, à travers leurs récepteurs et les ligands correspondants (protéines) adhérer à la couche de protéines présente sur le biomatériau et réagir à cette couche (voir Figure 1-5) [2]. Par exemple, l'adhésion d'une cellule nécessite que les protéines d'adhésion appropriées soient présentes, tandis que la prolifération requiert que les facteurs de croissance et les cytokines adéquats soient adsorbés sur la surface [31]. Ainsi, cette interaction règle un ensemble de mécanismes intracellulaires déterminant la survie, l'expression génétique, la synthèse et le phénotype, soit les caractéristiques observables, de la cellule [30]. Les cellules sont également capables d'adhérer sur une surface malgré l'absence de sérum dans le milieu de culture (donc en l'absence de biomolécules et protéines). D'autres mécanismes que ceux présentés ici en sont responsables [32].

Les interactions entre une surface synthétique et les cellules vivantes (du corps humain par exemple) sont ainsi au cœur de ce projet. Comme décrites plus haut, ces interactions se produisent, entre autres, via des réactions physico-chimiques entre les groupements fonctionnels de la surface, les biomolécules présentes et, ensuite, les cellules. Ainsi, si l'on veut favoriser l'adhésion des cellules sur une surface, il faut optimiser les réactions physico-chimiques qui ont lieu entre ces acteurs. L'intérêt de la fonctionnalisation de surface, que ce soit par polymérisation plasma, par photochimie d'ultraviolets lointains, par modification par plasma ou par dépôt chimique en phase vapeur, est d'ajouter des groupements fonctionnels présélectionnés sur des

matériaux qui en sont dépourvus, tels que les polymères organiques conventionnels (polyoléfines, polyester, poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE), etc.). Par l'ajout de groupements fonctionnels adéquats, il est possible de favoriser l'adhésion, la prolifération, la migration, la différenciation et la résistance à l'apoptose de cellules humaines ou animales. Il est également possible de favoriser la répulsion des cellules sur une surface, utile dans le développement des biomatériaux antithrombogéniques ou *antifouling* (surfaces qui repoussent les protéines et les cellules vivantes) [33]. Les pétris de polystyrène traités par plasma pour améliorer la culture des cellules sont couramment utilisés en culture cellulaire [34].

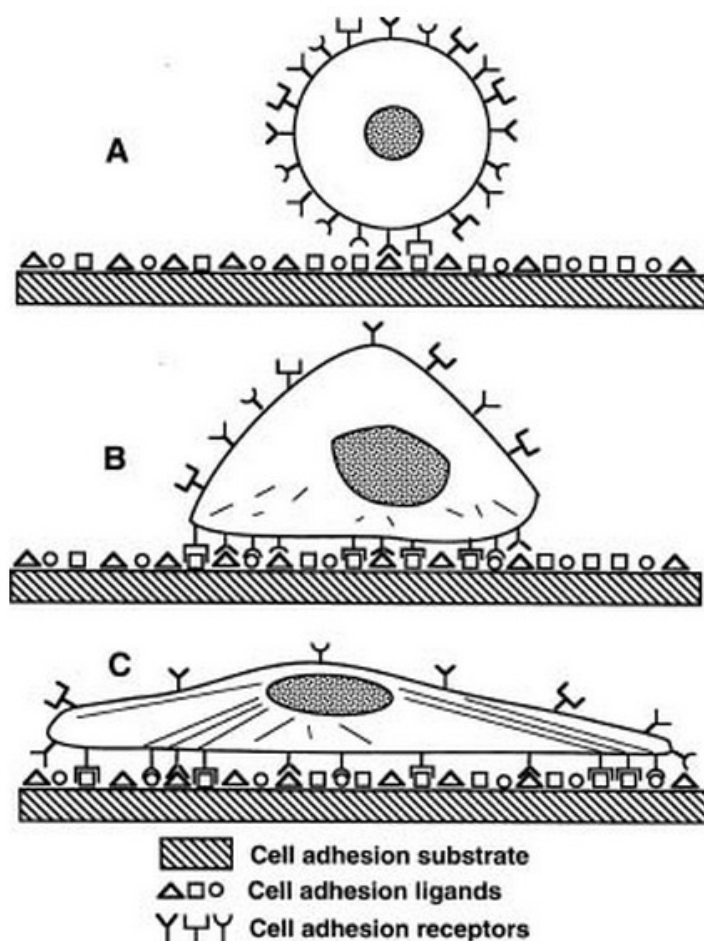


Figure 1-5: Mécanisme d'adhésion général d'une cellule sur une surface via ses récepteurs et les ligands disponibles. Reproduite de la référence [35], avec l'autorisation de reproduction de Landes Bioscience.

1.2.1 Amines primaires

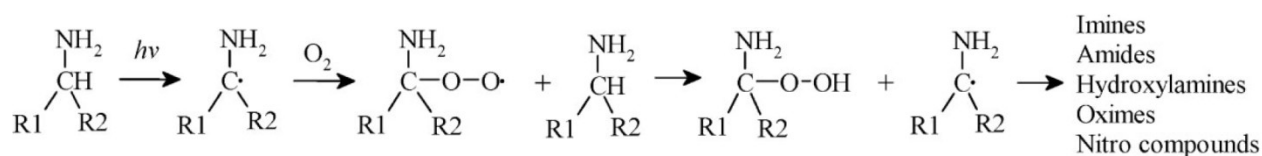
Plusieurs types de groupements fonctionnels sont d'intérêt pour favoriser l'adhésion cellulaire : les groupements carboxyles (COOH), les groupements hydroxyles (OH) et les amines primaires (R-NH₂), etc. Le groupement fonctionnel d'intérêt principal dans ce projet est l'amine primaire. Lorsqu'un groupement R-NH₂ est immergé dans un milieu aqueux à pH physiologique (pH \approx 7,4), il forme un groupement NH₃⁺ et libère un groupement OH⁻ dans l'eau, ce qui résulte en une charge nette positive sur la surface riche en R-NH₂. Cela favorise les interactions électrostatiques avec les protéines possédant des charges négatives, attirant ainsi ces protéines sur la surface de culture et, selon la nature de ces protéines, favorisant l'adhésion des cellules [5]. Un des exemples d'utilisation des groupements R-NH₂ est la commercialisation du PrimariaTM (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), une surface de culture cellulaire traitée par plasma pour incorporer des groupements fonctionnels azotés sur la surface d'un pétri, dont R-NH₂ [34].

1.2.2 Fabrication de surfaces riches en amines primaires

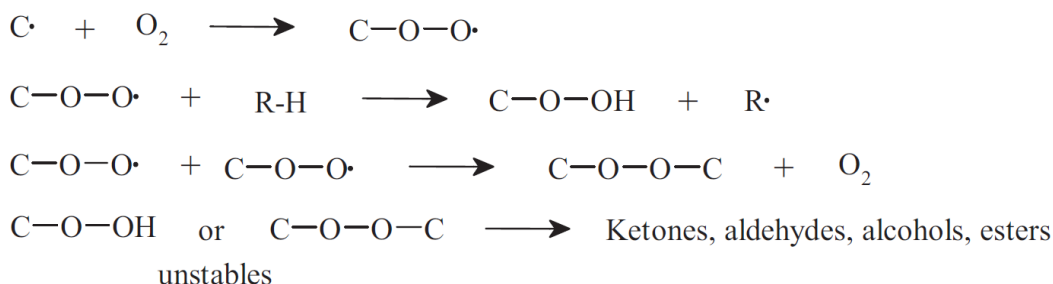
Il existe plusieurs techniques pour ajouter des groupements R-NH₂ sur la surface d'un biomatériau, détaillées aux sections 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3 et 1.1.4. Chacune de ces techniques possède ses forces et ses faiblesses. De façon générale, l'avantage de la polymérisation plasma par rapport à la modification par plasma est la concentration de groupements fonctionnels qu'il est possible d'intégrer à la surface. En effet, avec les bonnes conditions de dépôt, une plus grande concentration de groupements fonctionnels peut être atteinte avec la polymérisation plasma [22]. La technique de dépôt par photochimie d'ultraviolets lointains est une toute nouvelle technique qui permet d'intégrer une quantité de groupements fonctionnels similaire à la polymérisation-plasma et qui permet des réactions plus spécifiques permettant l'obtention d'une sélectivité [NH₂]/[N] plus élevée (voir section 1.1.2).

Chacune de ces techniques, toutefois, est sujette au phénomène du vieillissement. Il s'agit là d'un changement de la composition chimique en fonction du temps. Plusieurs facteurs influencent ce phénomène; ils sont énoncés au Tableau 1.1. Parmi ceux-ci, l'oxydation et la solubilité sont deux facteurs qui affectent particulièrement les R-NH₂. L'oxydation des amines primaires par l'oxygène de l'air ambiant est néfaste à un stockage à long terme, tandis que la solubilité, dans les cas de dépôt de couches minces, nuit à l'utilisation du revêtement en milieu aqueux, donc dans la

plupart des milieux physiologiques. Le mécanisme proposé d'oxydation du carbone des amines primaires est, d'après Ruiz *et al.* [14], le suivant :



L'hydrolyse des R-NH₂ par l'humidité de l'air ambiant est également un processus résultant en une augmentation de la concentration d'oxygène. C'est pour cette raison qu'une étude du vieillissement au contact de l'air et de l'eau est essentielle au développement de biomatériaux performants dont les surfaces sont riches en amines primaires. Les radicaux libres (voir section 1.1.1.2) créés lors de la polymérisation plasma ou par ultraviolets sont également responsables du vieillissement lorsqu'ils se recombinent avec les molécules de l'air ambiant, comme O₂ et H₂O, par exemple. Voici le mécanisme proposé par Ruiz *et al.* [14] :



La réorganisation hydrophobe est également un mécanisme de vieillissement présent dans ce type de couche mince. Dans ce phénomène thermodynamique, les groupements polaires à la surface du matériau ont tendance à s'enfouir à l'intérieur, réduisant leur concentration surfacique.

Tableau 1.1: Facteurs influençant le vieillissement d'un revêtement de surface. Adapté de [22].

Facteurs	
Internes	Externes
Entropie	Oxydation
Enthalpie interfaciale	Solubilité
Densité de réticulation	Adsorption de contaminants
	Température

1.2.2.1 Polymérisation plasma

Si la voie de la polymérisation plasma est choisie, l'incorporation d'amines primaires sur un matériau se fait via le dépôt d'un revêtement de PP sur ce substrat. Les caractéristiques voulues pour ce type de revêtement sont une haute concentration en amines primaires, $[\text{NH}_2]$, jumelée à une solubilité minimale, lorsque le revêtement est utilisé dans le cadre d'application en solution aqueuse, telle que la culture cellulaire ou pour des dispositifs destinés à être implantés. L'expérience démontre que plus la concentration d'azote est élevée, plus la solubilité du revêtement est grande [14]. Donc, l'obtention d'un revêtement insoluble et riche en R-NH_2 est un défi à relever.

Plusieurs groupes de recherche travaillent sur le développement de couches minces riches en amines primaires pour des fins biomédicales en utilisant diverses conditions de dépôt. Par exemple, Yang *et al.* [36] utilisent l'allylamine (AA, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NH}_2$) comme gaz précurseur pour déposer une couche riche en amines primaires sur une surface de TiO_2 afin d'y greffer de l'héparine. Zhao *et al.* [37] contrôlent la croissance cellulaire des fibroblastes de souris et d'ostéoblastes humains grâce au dépôt d'un PP créé à base d'heptylamine (HA, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$) en vapeur. Artemenko *et al.* [38], quant à eux, ont caractérisé extensivement des revêtements créés par pulvérisation magnétron de Nylon destinés à des applications biomédicales. Lassen *et al.* [39] ont étudié l'adsorption compétitive de protéines sanguines sur un revêtement polymérisé à partir de 1,2-diaminocyclohexane (DACH, $\text{C}_6\text{H}_{10}(\text{NH}_2)_2$).

Deux systèmes de polymérisation plasma de revêtements riches en R-NH_2 sont disponibles dans le laboratoire du Professeur Wertheimer de l'École Polytechnique. Premièrement, un système à pression atmosphérique avec éthylène (C_2H_4) et azote (N_2) dont les revêtements riches en R-NH_2 , nommés H-PPE:N, ont montré leur capacité d'augmenter l'adhésion et la croissance cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires, des fibroblastes et des cellules souches mésenchymateuses [40, 41]. Deuxièmement, un réacteur plasma r.f. à basse pression avec éthylène (C_2H_4) et ammoniac (NH_3) (décrit plus en détail à la section 2.1.1) permet de déposer une couche mince riche en R-NH_2 de polymère-plasma nommé L-PPE:N [42]. Une étude caractérisant la stabilité physico-chimique de ces deux revêtements a été effectuée dans le laboratoire par Ruiz *et al.* [14]. Celle-ci a permis d'identifier un type de L-PPE:N idéal pour la culture cellulaire en raison de sa faible solubilité et de sa haute concentration en groupements

R-NH₂. Ce revêtement est le L-PPE:N déposé avec un ratio R de gaz égal à 0,75; il est utilisé au cours de ce projet comme surface de référence. Il a démontré sa capacité à promouvoir l'adhésion et la croissance des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine [12]. Il a également permis de greffer des biomolécules actives pour créer des surfaces anti-apoptotiques [43]. Il a également été utilisés pour inhiber l'expression du collagène de type X dans une culture cellulaire de cellules souches mésenchymateuses provenant de patients souffrant d'arthrose [41].

1.2.2.2 Photo-polymérisation ultraviolette

Cette technique de dépôt a été développée par le laboratoire du Professeur Wertheimer et est, à la connaissance de l'auteur de ce document, la seule de ce type en fonction pour le dépôt de couches minces riches en groupements R-NH₂. Un système de dépôt de ce type est disponible dans notre laboratoire à l'École Polytechnique et est extensivement utilisé pour le présent projet. Ce système a tout d'abord été utilisé pour étudier l'incorporation d'azote dans les polyoléfines par photochimie VUV dans une atmosphère à basse pression d'ammoniac par Truica-Marasescu *et al.* [44]. Il a ensuite été utilisé pour le dépôt de couches minces, à base d'éthylène, riches en groupements R-NH₂ par photo-polymérisation ultraviolette (UV-PE:N) [26]. En raison d'une aire de dépôt initiale très petite (voir section 2.1.2), peu d'expériences de culture cellulaire ont été effectuées sur des revêtements créés par ce système. Girard-Lauriault *et al.* [9] ont toutefois pu cultiver des monocytes U937 sur ce type de surface. L'étude est détaillée à la section 1.3.1. La caractérisation de la stabilité de l'UV-PE:N a été effectuée par Ruiz *et al.* [14] et Truica-Marasescu *et al.* [24] et les ratios R valant 0,75 et 1 entre les deux gaz lors du dépôt ont été identifiés comme revêtements adaptés à la culture cellulaire pour leurs concentration et rétention élevées, au contact de l'air et de l'eau, de R-NH₂ ainsi que pour leur faible solubilité.

1.2.2.3 Modification de surface

Plusieurs groupes de recherche utilisent la modification par plasma pour incorporer des amines primaires à la surface d'un polymère. Ramires *et al.* [45] ont modifié par plasma d'ammoniac ou d'oxygène le poly(éthylène téréphtalate) (PET) afin de promouvoir la croissance de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC). Pu *et al.* [46] ont également utilisé un plasma d'ammoniac pour améliorer la prolifération des HUVEC sur le PET et le PTFE. Chen *et al.* [47] ont modulé les réponses cellulaires grâce à la combinaison d'un plasma d'azote (N₂) et d'hydrogène (H₂) et une topographie de surface particulière créée dans du polystyrène-co-

maleicanhydride (PSMAA). Bergemann *et al.* [48] ont stimulé la migration cellulaire d'ostéoblastes humains à travers une matrice artificielle de polycarbonate (PC) grâce à un traitement au plasma d'ammoniac (NH_3).

1.2.2.4 Dépôt chimique en phase vapeur

L'obtention d'une haute valeur de $[\text{NH}_2]$ sur la surface, ainsi qu'une solubilité minimale est aussi souhaitée pour les revêtements déposés par d'autres procédés de polymérisation classique, tels que le dépôt de parylène [49]. Ce dernier est un type de polymère créé par dépôt chimique en phase vapeur à partir d'un dimère de base, le poly(p-xylylène) (décrit à la section 2.1.3). Il existe une multitude de dimères de base possédant diverses fonctionnalités. Le parylène d'intérêt pour ce projet est la version diX AM (Kisco Conformal Coating LLC, San Jose, USA) possédant un groupement R-NH_2 (voir Figure 2-3A). Un des avantages de ce type de couche mince est qu'en raison de son procédé de fabrication et de sa molécule précurseure, les amines primaires constituent le seul groupement azoté présent dans le parylène diX AM, à la différence des revêtements déposés par plasma ou ultraviolets. Byoung-Jin *et al.* [50] ont utilisé le parylène diX A, une variété de parylène légèrement différente du diX AM, contenant aussi un groupement R-NH_2 , comme couche intermédiaire dans un senseur de résonance des plasmons de surface, instrument qui mesure la liaison entre un ligand et un récepteur. Ce type de parylène a également été utilisé par Robinson *et al.* [51] dans un système de livraison de médicaments ciblé.

1.3 Problématiques étudiées

Cette section présente les deux applications biomédicales reliées au domaine des biomatériaux pour lesquelles le potentiel d'utilisation d'une couche mince organique déposée par photo-polymérisation ultraviolette à basse pression, l'UV-PE:N, sera étudié au cours de ce projet.

1.3.1 Arthroplastie de la hanche

L'arthroplastie de la hanche est une opération visant à rétablir le fonctionnement de l'articulation de la hanche lorsque celle-ci devient trop douloureuse [6]. Cette douleur est généralement associée à l'arthrite ou à une autre maladie articulaire reliée à l'âge des patients et à la dégénération du cartilage. L'arthroplastie de la hanche consiste à remplacer par une prothèse

les parties détériorées de l'articulation. Une radiographie d'une prothèse de hanche est présentée à la Figure 1-6.

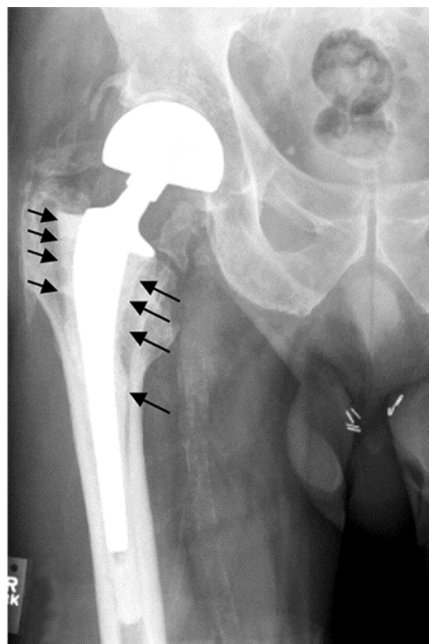


Figure 1-6: Radiographie préopératoire de la hanche d'un patient avant une deuxième reprise de la chirurgie due au descellement aseptique. Les flèches dénotent des régions de résorption du tissu osseux [52], reproduite avec permission.

D'après le Registre canadien des remplacements articulaires (RCRA), 28 045 arthroplasties de la hanche ont été effectuées dans les hôpitaux canadiens du 1er avril 2005 au 31 mars 2006, ce qui représente une augmentation de 62 % par rapport à 1995-1996 [6]. De ce nombre, 13 000 remplacements de la hanche étudiés plus en profondeur révèlent que 12 % des interventions étaient des deuxièmes, troisièmes ou quatrièmes reprises chirurgicales et plus. La cause la plus commune de ces reprises était le descellement aseptique (perte de fixation de la prothèse) , dans 48 % des cas [6]. Ce dernier représente donc un problème majeur de défaillance d'une prothèse de hanche et une cause importante de chirurgies qui pourraient être évitées.

Le descellement aseptique se produit lorsque l'os autour de la prothèse est dégradé par ostéolyse périprothétique, tel que présenté par les flèches sur la Figure 1-6. Les observations cliniques indiquent que ce problème serait relié à la réaction du corps face aux particules d'usure produites par le frottement entre les deux parties de la prothèse soit la cupule et la tête fémorale [7]. Ces deux parties peuvent être constituées de différents matériaux. Dans l'étude

approfondie faite par le RCRA, 79 % des surfaces d'appuis utilisées étaient métal sur plastique, 14 % céramique sur céramique, 6 % métal sur métal et 2 % étaient céramique sur plastique. Le métal, constitué dans la majorité des cas de cobalt et de chrome représente donc une surface très utilisée lors de l'arthroplastie de la hanche [6]. Le frottement continu des deux parties lors du déplacement de l'articulation crée des particules d'usure, par exemples Co^{2+} et le Cr^{3+} .

Le mécanisme menant à la résorption osseuse (dégradation du tissu osseux et réabsorption des minéraux) et au descellement aseptique des implants implique les monocytes et les macrophages, qui font partie de la famille des leucocytes (globules blancs) et interviennent dans le système immunitaire. Les monocytes se déplacent habituellement dans les vaisseaux sanguins, puis transitent vers les organes, où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques pour participer à la réponse immunitaire. Les monocytes, ainsi que les macrophages, sont des cellules phagocytaires, c'est-à-dire qu'elles enveloppent et ingèrent les cellules apoptotiques, les pathogènes et les particules étrangères au corps humain [53]. Lorsqu'un implant est placé dans le corps, les monocytes et les macrophages migrent vers celui-ci en raison des cytokines produites dans l'environnement de l'implant. Par la suite, les monocytes adhèrent à l'implant et se différencient en macrophages. Ceux-ci vont par la suite, soit tenter d'envelopper l'implant en se fusionnant, créant ainsi des cellules géantes, soit tenter de phagocyter les particules d'usure créées par le frottement de l'implant.

L'interaction entre les macrophages et les monocytes, les particules d'usure et les cellules osseuses n'est pas entièrement comprise [8]. Il existe deux catégories de cellules osseuses : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont responsables de la production du tissu osseux tandis que les ostéoclastes sont à l'origine de la résorption du tissu osseux. L'idée actuellement acceptée est que les particules d'usure stimulent la production par les monocytes de cytokines promouvant la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes. Il est toutefois difficile de cultiver *in vitro* des monocytes humains qui ne sont pas des cellules primaires (obtenues directement d'un sujet humain). En effet, la lignée cellulaire de monocytes humains U937 [54] n'adhère pas aux surfaces de culture *in vitro* disponibles typiquement, soit le poly(styrène) (PS), le poly(styrène) pour culture cellulaire (TCPS), le PE, le poly(propylène) (PP), le PET, le PTFE et le PrimariaTM (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), une surface spécialement conçue pour la culture cellulaire. Cela pose un problème lors de l'étude de l'interaction de ces cellules avec les particules d'usure parce que ces particules coulent au fond de la boîte de pétri de culture alors

que les monocytes demeurent en suspension [7, 8, 55]. C'est pourquoi le développement d'une surface permettant l'adhésion de la lignée cellulaire de monocytes U937, jugée représentative de la réaction des monocytes humains *in vivo* [56], est important.

La stratégie employée pour ce faire est basée sur des travaux de Girard-Lauriault *et al.* [9] démontrant l'importance des amines primaires lors de l'adhésion des monocytes sur une surface. Au cours de cette étude, la concentration d'azote critique, $[N]_{crit}$, sur la surface nécessaire à l'adhésion des monocytes U937 a tout d'abord été déterminée pour plusieurs types de revêtements. Une valeur différente de $[N]_{crit}$ a été mesurée pour chacun de ces revêtements, sauf dans le cas du revêtement polymérisé par plasma à pression atmosphérique à base d'acétylène, riche en azote (H-PPA:N), où aucune adhésion n'a été observée, même en présence d'une haute valeur de $[N]$. Un exemple de ce seuil critique d'azote est représenté à la Figure 1-7. Sur l'image de gauche, la concentration d'azote est suffisante ($[N] = 25$ % d'atomes mesurés par spectroscopie des photoélectrons X (at.%) pour promouvoir l'adhésion des monocytes sur toute la surface, tandis que sur l'image de droite (où $[N] = 23$ at.%), on peut constater que, malgré une différence de concentration de seulement 2 at.%, il n'y a pratiquement pas d'adhésion de monocytes sur la surface. La valeur de $[N]_{crit}$ est donc environ 24 at.% pour ce revêtement. La Figure 1-8 rapporte les valeurs de $[N]_{crit}$ pour les autres revêtements étudiés (barres d'histogrammes).

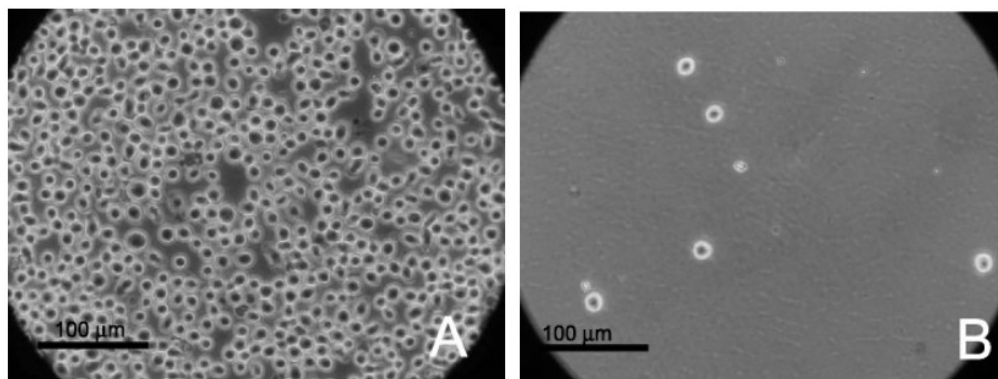


Figure 1-7: Démonstration de l'effet de $[N]_{crit}$ sur l'adhésion des monocytes U937. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure sur des films de H-PPE:N (PP déposé à pression atmosphérique à base d'éthylène riche en azote) où : A) $[N] = 25$ at.%, et B) $[N] = 23$ at.% [9], reproduite avec permission.

L'étape suivante du projet de Girard-Lauriault *et al.* a été de déterminer la concentration d'amines primaires sur chacune des surfaces, c'est-à-dire, quelle proportion de l'azote

correspondant à $[N]_{\text{crit}}$ est sous la forme d'un groupement $R-NH_2$. Cette concentration, $[NH_2]_{\text{crit}}$, est présentée sur la Figure 1-8 pour chacun des revêtements avec un point dans la barre d'histogramme. Le fait particulièrement frappant ici est que la valeur de $[NH_2]_{\text{crit}}$ est très similaire pour chacun des revêtements, alors que $[N]_{\text{crit}}$ varie grandement. Cela indique que ce n'est pas $[N]$ qui est un facteur dans l'adhésion des monocytes U937 sur une surface, mais plutôt $[NH_2]$, qui doit être au minimum $4,2 \pm 0,5$ at.% (ligne pointillée de la Figure 1-8). Ce résultat est confirmé par l'absence d'adhésion sur le H-PPA:N, revêtement qui, malgré une très haute valeur de $[N]$, contient moins de 2,0 at.% d'amines primaires, ce qui est sous le seuil critique.

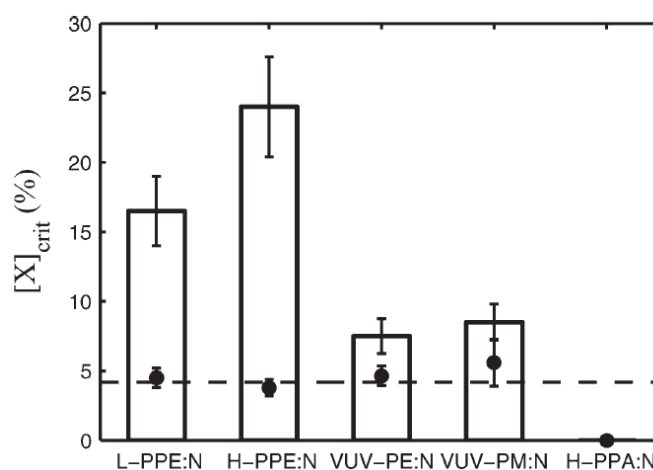


Figure 1-8: Mesure de la concentration $[NH_2]_{\text{crit}}$ nécessaire à l'adhésion des monocytes U937 sur différents revêtements. Les barres d'histogramme représentent $[N]_{\text{crit}}$ tandis que les points représentent $[NH_2]_{\text{crit}}$. L'absence de barre d'histogramme et de point pour le H-PPA:N indique qu'aucune adhésion n'a été observée, signifiant qu'aucun seuil critique d'adhésion n'a été observé. La valeur moyenne de $[NH_2]_{\text{crit}}$ est représentée par la ligne horizontale pointillée et correspond à $4,2 \pm 0,5$ at.% [9], reproduite avec permission.

Outre l'adhésion cellulaire, les propriétés des surfaces de culture influencent d'autres mécanismes cellulaires, notamment leur expression génétique. L'expression génétique d'une cellule est le processus par lequel un gène de son code génétique est utilisé pour produire un produit génique, tel que les protéines. Pour produire ces dernières, un gène est tout d'abord transcrit en acide ribonucléique (ARN) messenger (ARNm) dans le noyau de la cellule eucaryote, puis en protéine via la traduction de l'ARNm par un ribosome dans le cytoplasme. L'expression génétique règle donc le phénotype de la cellule, soit les caractéristiques observables, à partir de son code génétique (génotype). Puisque la surface sur laquelle les cellules sont adhérentes

influence le comportement de la cellule (voir section 1.2) et, donc son expression génétique [31], il est nécessaire d'étudier l'effet de cette surface sur les monocytes U937. L'expression génétique de ces cellules lors de leur adhésion sur différentes surfaces riches en amines primaires a également été étudiée par Girard-Lauriault *et al.* pour les gènes des cytokines TNF- α et Il-1 β , entre autres. Ces cytokines sont sécrétées par les monocytes lors d'une réponse immunitaire et sont reconnues pour jouer un rôle central dans l'ostéolyse des implants orthopédiques [57, 58]. Girard-Lauriault *et al.* ont observé une augmentation transitoire de l'expression génétique de TNF- α et Il-1 β atteignant 15 et 7 fois celle du contrôle (suspension cellulaire), après 3 h d'adhésion (voir Figure 1-9). L'augmentation de l'expression génétique du contrôle après 3 h d'adhésion représente l'effet de la méthodologie employée sur les cellules pour effectuer l'inoculation. L'expression revient par la suite à la normale après 12 h et demeure similaire à l'expression du contrôle jusqu'à 24 h d'adhésion, permettant de conclure qu'une réponse inflammatoire transitoire s'est produite lors de l'adhésion des monocytes U937 sur le L-PPE:N. L'obtention d'une surface de culture qui n'induit pas une réponse inflammatoire soutenue est nécessaire pour effectuer l'étude de l'interaction entre les monocytes et les particules d'usure.

Un des objectifs du projet est donc d'évaluer le potentiel de couches minces organiques déposées par photo-polymérisation ultraviolette riches en amines primaires (UV-PE:N) comme surface adaptée à la culture des monocytes U937. Pour ce faire, l'adhésion et l'expression génétique (TNF- α et Il-1 β) de ces cellules seront étudiées.

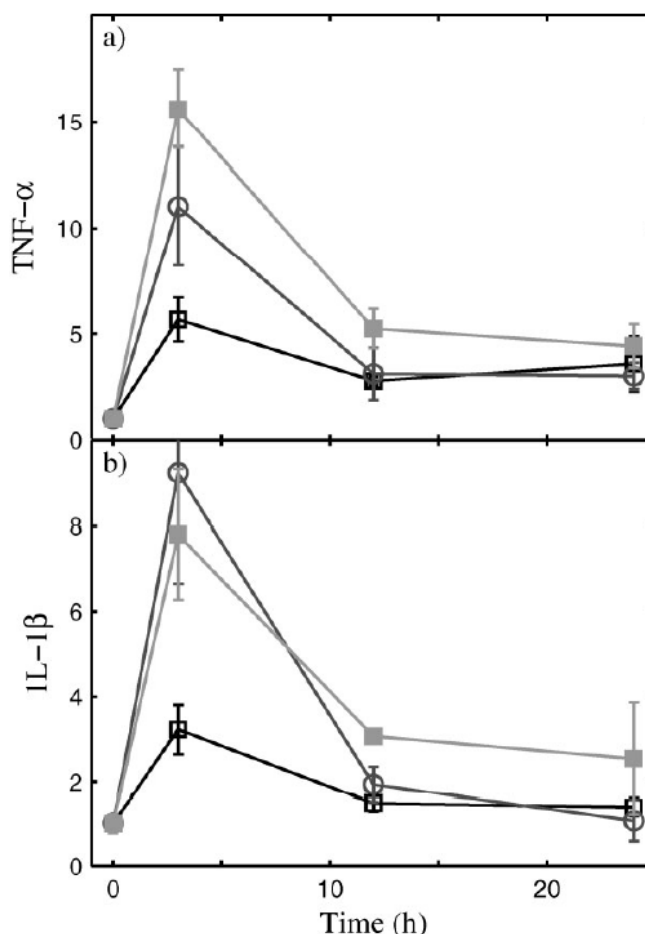


Figure 1-9: Expression génétique des cytokines TNF- α et IL-1 β par les monocytes U937. Ces derniers ont été cultivés jusqu'à 24 h en suspension (contrôle) (□) et sur H-PPE:N (○) et L-PPE:N (■), contenant $[\text{NH}_2] > [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart-type de 3 expériences [9], reproduite avec permission.

1.3.2 Médecine vasculaire

Une autre problématique visée par ce projet de maîtrise concerne l'amélioration de l'adhésion de cellules endothéliales à la paroi interne d'une prothèse vasculaire. En Europe et aux États-Unis, plus d'un million de pontages coronariens et des membres périphériques sont pratiqués par année [59]. Un pontage consiste à remplacer une partie d'une artère ou d'une veine par une autre artère ou veine provenant du patient ou par une prothèse afin de rétablir le débit sanguin. L'utilisation d'un vaisseau sanguin autologue constitue la méthode de choix pour effectuer un pontage réussi puisque les propriétés physiques du vaisseau prélevé sont celles qui se rapprochent le plus de celles du vaisseau original. Cette technique est toutefois impossible à

appliquer dans certains cas où aucun vaisseau du patient n'est disponible ou adéquat, soit parce qu'il a déjà été utilisé pour un autre pontage, ou soit pour des raisons de maladie affectant la qualité du vaisseau. L'utilisation d'une prothèse synthétique est donc la solution. Toutefois, l'utilisation d'une prothèse purement polymérique mène à des défaillances dans le cas d'un remplacement de vaisseau de petit diamètre (moins de 6 mm) [10]. Plusieurs raisons expliquent cette tendance à l'échec : thrombogénicité de la prothèse, une disparité entre les compliances du vaisseau (aptitude du vaisseau à changer de volume lorsqu'une pression est appliquée) et de la prothèse et l'absence de couche de cellules endothéliales sur la paroi interne de la prothèse [11]. Les matériaux couramment utilisés pour former une prothèse sont le PET tissé (DACRON) et le PTFE expansé (ePTFE).

Une des stratégies employées pour améliorer le succès de l'implantation d'une prothèse vasculaire est l'inoculation de cellules endothéliales sur la paroi interne de la prothèse afin de créer une couche continue de ces cellules, créant ainsi une barrière entre le sang circulant à l'intérieur et la prothèse. Dans un vaisseau sanguin, cette couche de cellules sert de barrière entre le sang et la paroi artérielle ou veineuse et permet de contrôler la thrombogénicité, l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des leucocytes et la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses [11]. La technique actuellement utilisée en clinique pour créer une telle couche de cellules endothéliales est une technique à deux étapes. Elle nécessite d'abord le prélèvement de cellules provenant du patient; la culture *in vitro*, pendant deux à quatre semaines, de ces cellules dans un pétri afin qu'elles prolifèrent; puis leur inoculation sur la prothèse avant l'implantation [60]. Toutefois, il est difficile de créer une couche endothéliale complète et totalement résistante au débit sanguin et elle comporte le désavantage de nécessiter une période d'attente de deux à quatre semaines, période que certains patients ne peuvent se permettre. Également, le risque d'infection de la culture *in vitro* augmente avec le temps de culture [61]. C'est pourquoi une technique à une seule étape, où les cellules sont prélevées du patient et directement inoculées sur la prothèse, sans période d'attente de plusieurs jours laissant le temps aux cellules de proliférer, serait idéale. Cette technique nécessite toutefois une efficacité d'adhésion et de résistance au débit sanguin des cellules qui soient suffisantes pour maximiser l'intégrité de la couche endothéliale.

L'ingénierie de surface propose d'améliorer l'adhésion et la croissance des cellules endothéliales sur une prothèse par diverses techniques de fonctionnalisation de surfaces. La

modification de surface par plasma d'ammoniac [45, 46] et l'ajout de protéines d'adhésion sur la surface de la prothèse [62] sont des avenues possibles. Gigout *et al.* [12] ont plutôt opté pour le dépôt de couches minces riches en R-NH₂ destinées à promouvoir l'adhésion et la résistance au débit sanguin des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), un modèle de cellules endothéliales. Ainsi, le pourcentage d'adhésion des HUVEC à 30 min, 1, 2, 4 et 8 h a été étudié sur plusieurs surfaces : le PET, matériel constituant les prothèses, le L-PPE:N et le H-PPE:N, deux revêtements polymérisés par plasma riches en R-NH₂ déposés sur PET et le PS gélatiné, un contrôle positif reconnu pour promouvoir la prolifération des HUVEC. Les résultats, présentés à la Figure 1-10, démontrent que les revêtements polymérisés par plasma riches en amines primaires augmentent significativement le pourcentage et le taux d'adhésion comparativement au PET et au PTFE.

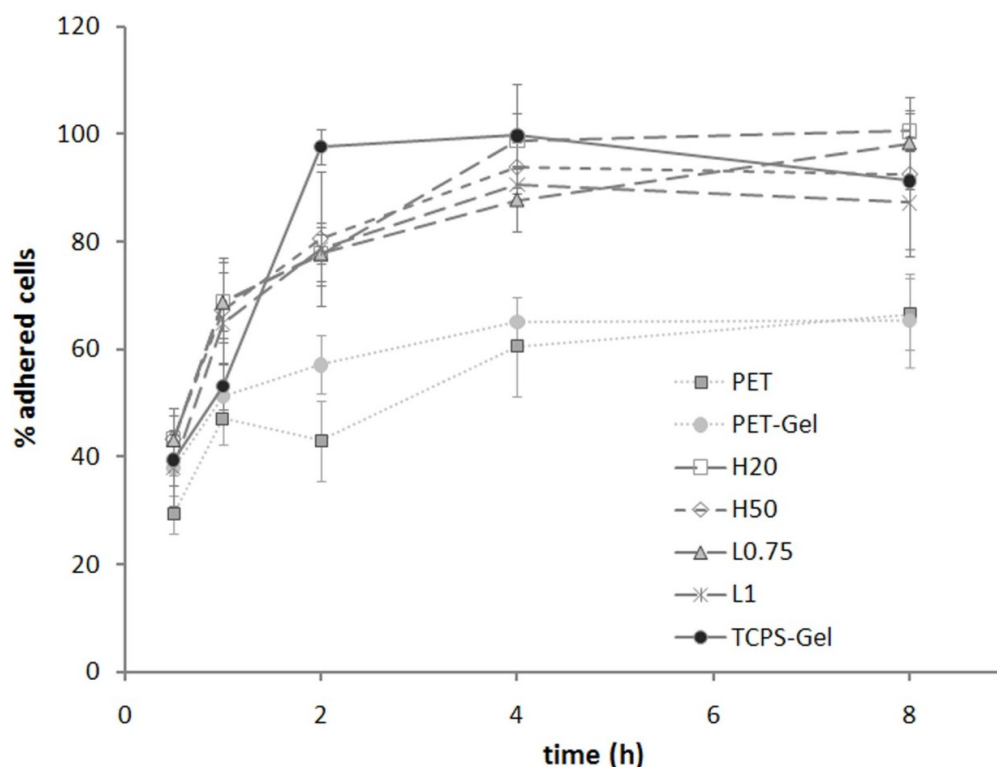


Figure 1-10: Cinétique d'adhésion des HUVEC sur PET, PET gélatiné, H-PPE:N (20 sccm, H20), H-PPE:N (50 sccm, H50), L-PPE:N (R = 0,75, L0.75), L-PPE:N (R = 1, L1) et PS gélatiné. Dans le cas du H-PPE:N, 20 et 50 sccm correspondent au débit de l'ammoniac dans le réacteur lors du dépôt. Le ratio R représente le ratio des gaz insérés dans le système de dépôt du L-PPE:N : $R \equiv F_{NH_3}/F_{C_2H_4}$. La différence entre les surfaces polymérisées par plasma et le PET est significative ($p < 0,05$) sauf pour L-PPE:N (R = 1) à 30 min [12], reproduite avec permission.

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente les différentes techniques de dépôt de couches minces utilisées lors de ce projet. La théorie des différentes techniques de caractérisation physique de ces couches minces est ensuite présentée ainsi qu'une technique biologique permettant de caractériser l'expression génétique d'une cellule. Finalement, les conditions expérimentales des expériences réalisées dans le cadre de cette maîtrise sont présentées en détail. Puisque certaines expériences sont détaillées dans la section 3.2.3, celles-ci sont seulement résumées ici.

2.1 Techniques de dépôt des différents revêtements

2.1.1 L-PPE:N

La fabrication du L-PPE:N, polymère-plasma déposé à basse pression, à base d'éthylène, riche en azote, se base sur le principe de la polymérisation par plasma froid dans un réacteur r.f. à basse pression, présenté dans plusieurs articles [14, 42, 63, 64]. Le système est constitué d'une chambre cylindrique d'aluminium et d'acier d'environ 20 cm de haut par 20 cm de diamètre (voir Figure 2-1). La pression de la chambre est initialement réduite sous 0,13 Pa (1 mTorr) à l'aide d'une pompe turbomoléculaire (Leybold, Cologne, Allemagne) suivie d'une pompe mécanique (Leybold, Cologne, Allemagne). Les gaz désirés sont ensuite introduits dans la chambre de dépôt via un distributeur de gaz en forme de pomme de douche (*shower head distributor*) de 10 cm de diamètre et des débitmètres électroniques (*flow meters*) (Vacuum General, San Diego, USA). Les gaz utilisés lors de ce projet sont l'éthylène (C_2H_4), avec un débit fixe de 20 sccm, et l'ammoniac (NH_3) avec un débit pouvant varier de 0 à 60 sccm. Le ratio R des deux gaz ($\equiv F_{NH_3}/F_{C_2H_4}$) peut donc varier entre 0 et 3. La pression interne p de la chambre est ensuite fixée à 80 Pa (600 mTorr) par une valve papillon (*butterfly valve*) (MKS, Andover, USA) reliée à un manomètre (*pressure gauge*) capacitif (MKS "Baratron", Andover, USA).

Un plasma à couplage capacitif généré par une source de r.f. de 13,56 MHz (ENI, Rochester, USA) est créé entre l'électrode de puissance, de 10 cm de diamètre, et les parois du réacteur, mis à la terre. Le bon couplage du plasma est assuré par un adaptateur d'impédance automatique (Plasma-Therm, St-Petersburg, USA). La distance entre le distributeur de gaz et l'électrode de puissance, où est posé le substrat recevant le dépôt, est de 15 cm. Plusieurs types de

substrats peuvent être utilisés : du verre, un morceau de gaufre de silicium cristallin (c-Si) ou des polymères, comme le poly(propylène) orienté biaxialement (BOPP), le polyimide (Kapton®) et le PET.

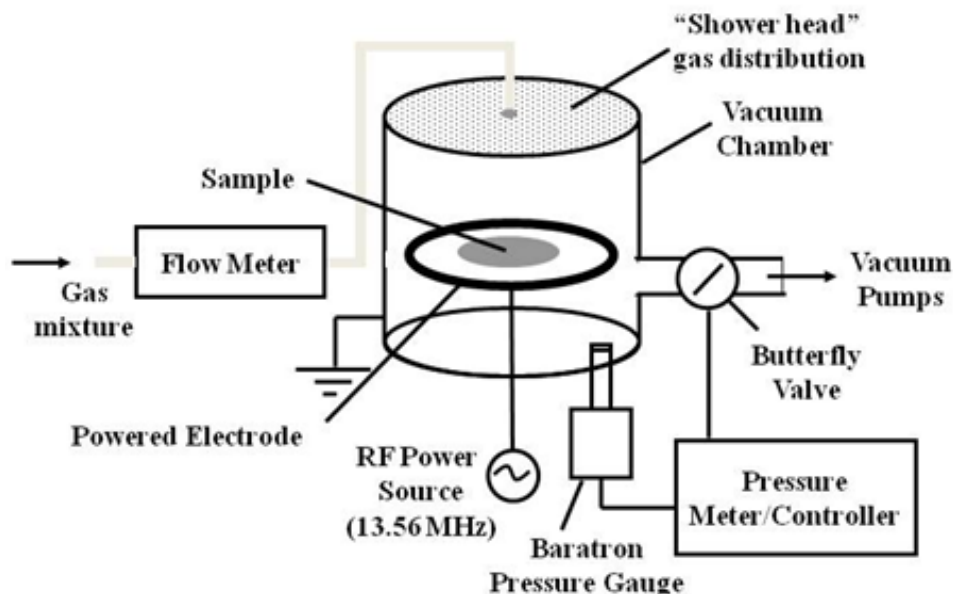


Figure 2-1: Schéma du système de dépôt par plasma r.f. à basse pression utilisé pour déposer un revêtement de L-PPE:N [64], reproduite avec permission.

Tous les résultats présentés dans les chapitres suivants ont été obtenus à l'aide des paramètres de dépôt résumés dans le tableau suivant.

Tableau 2.1: Paramètres utilisés pour le dépôt de L-PPE:N.

Paramètres	Valeur
Pression interne de la chambre	80 Pa (600 mTorr)
Puissance du plasma	10 W ($V_B = -40$ V)
Ratio R	0,75
Temps de dépôt	15 min
Épaisseur résultant du temps de dépôt	~ 100 nm
Substrats utilisés	c-Si et PET

2.1.2 UV-PE:N

Le système utilisé pour fabriquer les polymères-plasma déposés par ultraviolets à basse pression à base d'éthylène riche en azote (UV-PE:N) est décrit dans plusieurs articles [13, 14, 24-26, 65]. Il est constitué d'une chambre de dépôt en acier inoxydable en forme de croix (voir

Figure 2-2A) où la pression est tout d'abord réduite sous 0,13 Pa (1 mTorr) par une pompe turbomoléculaire (Leybold, Cologne, Allemagne) suivie d'une pompe mécanique (Leybold, Cologne, Allemagne). Les gaz voulus sont ensuite introduits dans la chambre de dépôt par des débitmètres électroniques (Vacuum General, San Diego, USA). Le débit d'éthylène (C_2H_4), $F_{C_2H_4}$, est gardé constant à 50 sccm tandis que le débit d'ammoniac (NH_3), F_{NH_3} , peut être varié entre 0 et 75 sccm. Le ratio R des deux gaz peut donc varier entre 0 et 1,5. La pression totale des gaz dans la chambre de dépôt est augmentée à 13,3 Pa (100 mTorr) lors du dépôt et maintenue constante par une valve papillon (MKS, Andover, USA) reliée à un manomètre capacitif (MKS "Baratron", Andover, USA).

La « polymérisation », pour ce système, se fait à l'aide de réactions photochimiques d'ultraviolets lointains (VUV). Plusieurs lampes sont disponibles pour ce système, soient des lampes au Krypton (Kr), au Xénon (Xe) et au deutérium (D_2) (Resonance, Ltd, Barrie, Canada). Ces lampes produisent des rayons VUV par une décharge électrique sans électrodes induite par des radiofréquences (100 MHz) dans un gaz noble. Chacun des gaz produit des rayons VUV d'une longueur d'onde, λ , différente, et donc d'énergie différente. Le Tableau 2.2 présente ces diverses valeurs. Ces gaz, à basse pression, sont contenus dans une ampoule scellée par une fenêtre en MgF_2 possédant une longueur d'onde de coupure de $\lambda_c = 112$ nm. La lampe au krypton est choisie pour ce projet en raison de la spécificité des réactions chimiques induite par cette énergie pour produire des groupements R- NH_2 (voir section 1.1.2) La distance entre le porte-échantillon et la lampe est fixée à 1 cm.

Tableau 2.2: Longueurs d'onde produites par chacune des lampes VUV

Gaz	Longueurs d'onde, λ
Kr	123,6 nm
Xe	147,0 nm
D_2	110-170 nm

Initialement, en raison de la taille réduite de la fenêtre de la lampe ($\varnothing = 1$ cm), il n'était pas possible de produire des échantillons de plus de 1 cm^2 dans un dépôt unique. Cela complique l'utilisation de ce revêtement en culture cellulaire où les études nécessitent généralement plusieurs échantillons de surface pour effectuer les expériences. Un porte-échantillon de type « convoyeur » a donc été fabriqué spécialement pour ce système (voir Figure 2-2B). Ce

convoyeur permet le défilement d'un ruban de substrat devant la lampe, rendant ainsi possible le dépôt d'un échantillon de 1 cm par 24 cm. Ceci nécessite des temps de dépôt plus longs qu'avec un porte-échantillon fixe, en raison du défilement du substrat. Toutefois, en raison des différents temps d'attente nécessaires à la production d'un dépôt (atteindre le vide initial, élimination des impuretés en laissant le substrat sous vide plusieurs minutes, vider les lignes de gaz, etc.) qui sont effectués 1 fois (pour un ruban de 24 cm²) au lieu de 24 fois (pour 24 échantillons de 1 cm²), il diminue globalement le temps de dépôt de l'UV-PE:N en grande surface. Plusieurs substrats peuvent être utilisés s'ils remplissent les deux conditions suivantes : le substrat doit pouvoir tenir sur le convoyeur et il doit résister à une possible dégradation par les rayons VUV. Une gaufre de silicium, coupée en carrés de 1 cm² collés le long du convoyeur, ou des polymères comme le Kapton® et le PET, très résistants aux VUV et coupés en ruban, peuvent être utilisés.

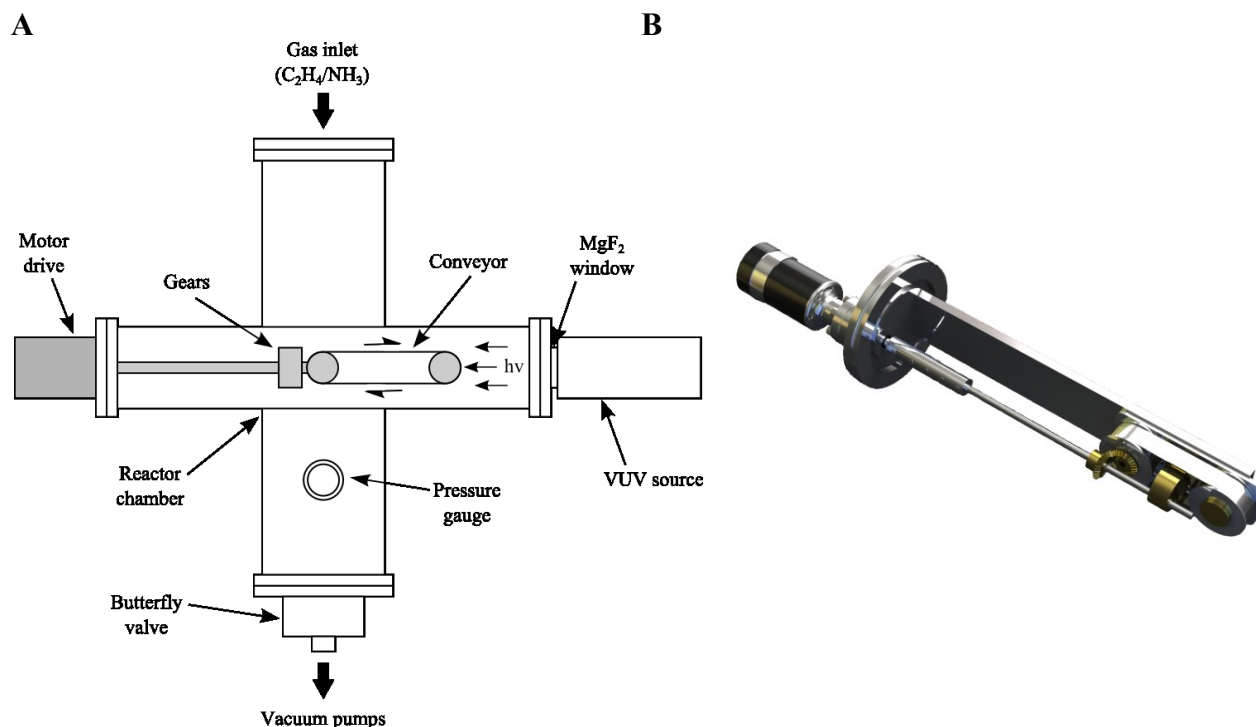


Figure 2-2: A): Schéma du système de dépôt par photo-polymérisation ultraviolette utilisé pour déposer l'UV-PE:N. B) Porte-échantillon de type « convoyeur » permettant de déposer le revêtement sur un ruban de 1 cm par 24 cm [13], reproduites avec permission.

Tous les résultats présentés dans les chapitres suivants ont été obtenus à l'aide des paramètres de dépôt résumés dans le tableau suivant.

Tableau 2.3: Paramètres utilisés pour le dépôt de l'UV-PE:N.

Paramètres	Valeur
Pression interne de la chambre	13,3 Pa (100 mTorr)
Lampe	Krypton ($\lambda = 123,6$ nm)
Ratio R	0,75 et 1
Temps de dépôt	4,5 h pour $R = 0,75$ et 7 h pour $R = 1$
Épaisseur résultant du temps de dépôt	~ 30 nm
Substrats utilisés	c-Si, Kapton [®] et PET

2.1.3 Parylène diX AM

Le système utilisé pour déposer le revêtement de parylène diX AM (Kisco Conformal Coating LLC, San Jose, USA) se situe à l'Institut Fraunhofer du génie des interfaces et biotechnologie (FhIGB), à Stuttgart en Allemagne. Ce système est basé sur le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) (voir section 1.1.4) [13, 49, 66, 67]. Puisque l'auteure n'a pas participé à la fabrication de ces revêtements, le système de dépôt n'est présenté ici que très brièvement. Tout d'abord, le poly-aminométhyl-[2,2]-paracyclophane est introduit sous forme d'un dimère en poudre (voir Figure 2-3A) dans le système (voir Figure 2-3B) et chauffé à 130 °C pour être sublimé. La vapeur traverse ensuite une région à haute température (650 °C) où le dimère est dissocié en deux fragments moléculaires (radicaux-monomères). Ces précurseurs radicalaires sont par la suite dirigés vers la chambre de dépôt sous vide à la température de la pièce, où ils se condensent et polymérisent sur le substrat pour former le revêtement de parylène sous forme de couche mince continue et lisse [49]. Les échantillons utilisés au cours de ce projet ont donc été fabriqués en Allemagne; ils consistent en une première couche mince d'environ 2 μm de parylène C (une version chlorée de la molécule) déposée sur du BOPP (poly(propylène) orienté biaxialement), suivi d'une deuxième couche de parylène diX AM d'environ 100 nm.

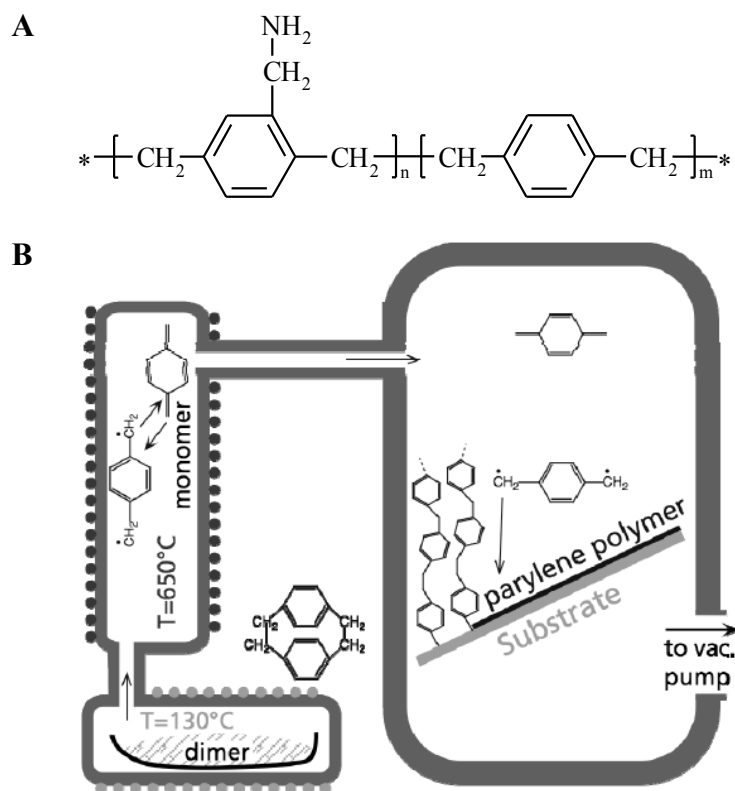


Figure 2-3: A) Dimère du parylène diX AM contenant un groupement R-NH_2 , où $m = n$ ([13], reproduite avec permission). B) Schéma du système de dépôt de parylène du FhIGB [66].

2.2 Techniques de caractérisation

2.2.1 Spectroscopie des photoélectrons X

Une des techniques de caractérisation les plus couramment utilisées en science des surfaces et des couches minces est la spectroscopie des photoélectrons X (XPS), aussi connue sous le nom de spectroscopie électronique pour l'analyse chimique (ESCA). Cette technique a valu le prix Nobel de physique en 1981 au Dr Kai Siegbahn [68]. Elle permet de mesurer quantitativement la composition chimique (sauf les éléments hydrogène et hélium) près de la surface d'un matériau condensé (moins de 10 nm de profondeur).

Plusieurs effets se produisent lorsqu'un photon X interagit avec un matériau. Le XPS se base sur l'éjection de photoélectrons de la surface due à l'interaction de ce matériau avec les photons. Le photon d'une énergie $h\nu$ élevée frappe un atome et ce dernier absorbe l'énergie du photon. Un électron provenant d'une couche profonde, par exemple la couche K, est éjecté de

l'atome (voir Figure 2-4) en possédant une énergie cinétique décrite par l'équation suivante :

$$E_k = h\nu - E_b - \phi \quad (2.1)$$

où E_k est l'énergie cinétique de l'électron éjecté (kinetic energy), $h\nu$ est l'énergie du photon incident, E_b est l'énergie de liaison de l'électron éjecté (binding energy) et ϕ est la fonction caractéristique propre à l'appareil XPS utilisé [69].

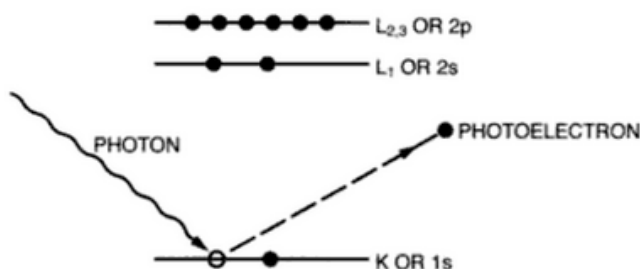


Figure 2-4: Diagramme représentant l'émission d'un photoélectron K par l'absorption d'un photon X [70], reproduite avec permission.

Ainsi, en mesurant l'énergie cinétique E_k de l'électron éjecté, et en connaissant l'énergie du photon incident (rayon X) ainsi que la fonction ϕ de l'appareil (reliée entre autres à la qualité du vide), il est possible de calculer l'énergie de liaison E_b de l'électron avant qu'il soit éjecté. Cette valeur particulière d'énergie de liaison d'électrons de cœurs (*core-electrons*) est propre à chaque élément, permettant ainsi de connaître précisément l'élément duquel l'électron a été éjecté.

Pour mesurer la concentration de différents éléments présents dans les premiers 10 nm d'une surface, l'échantillon est placé dans un système à ultravide ($< 10^{-7}$ Pa ou 10^{-9} Torr). La profondeur d'analyse est limitée à ce 10 nm en raison de la profondeur d'échappement (*escape depth*) des électrons. Ceux situés au-delà de cette profondeur dans le matériau réagissent avec le matériau et sont réabsorbés par celui-ci avant de se rendre à la surface. Ils ne sont pas éjectés du matériau et ne sont donc pas détectés. Un vide poussé est nécessaire afin que les électrons éjectés du matériau puissent se rendre au détecteur sans être diffusés par des collisions avec des molécules gazeuses résiduelles et afin d'éviter la contamination de l'échantillon par ces molécules. Ensuite, une source soigneusement sélectionnée de rayons X émet des photons d'énergie $h\nu$ (voir équation 2.1) connue précisément (afin de calculer le plus précisément possible l'énergie de liaison de l'électron éjecté). L'émission produite par la cible métallique des rayons X est composée de raies caractéristiques de transitions électroniques propres à cet élément. C'est

l'émission provenant de l'une de ces raies étroites qui est utilisée pour bombarder l'échantillon. Dans le cadre de ce projet, la cible utilisée est le magnésium (Mg) et sa raie $K\alpha$ [71] ($h\nu = 1\,253,6\text{ eV}$ [70]). Finalement, un spectromètre hémisphérique mesure l'énergie cinétique E_k des électrons émis par l'échantillon et produit un spectre des énergies de liaison E_b (voir la Figure 2-5) présentant des pics correspondant aux électrons de cette énergie caractéristique. Chaque pic correspond donc à un élément particulier sur la surface de l'échantillon et l'aire sous ce pic est reliée à la quantité de cet élément sur la surface par un facteur de sensibilité. L'aire est calculée en éliminant tout d'abord le bruit de fond. Plusieurs techniques de soustraction sont disponibles pour enlever ce bruit de fond. Dans ce projet, la technique utilisée est la soustraction Shirley qui assume que l'intensité du bruit de fond est proportionnelle au nombre total de photoélectrons sous cette énergie de liaison [72]. Il est donc possible de déduire quantitativement la concentration d'éléments présents sur une surface sauf l'hydrogène et l'hélium. Ces derniers possèdent des orbitales de cœur avec une section efficace trop petite; la probabilité d'interaction entre les rayons X et ces orbitales est donc trop faible pour que des électrons éjectés soient détectés en quantité suffisante. La concentration mesurée par XPS est exprimée en pourcentage atomique (at.%). Les résultats de ce projet sont obtenus à l'aide d'un VG ESCALAB 3MkII en utilisant la raie $K\alpha$ d'une cible de magnésium à une incidence normale (0°). L'analyse des résultats est effectuée par le logiciel Advantage v4.12 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)..

Comme il n'est pas possible de calculer la concentration absolue d'un élément en raison de l'absence de détection d'hydrogène et d'hélium, la concentration de chaque élément est souvent présentée, dans le domaine des matériaux organiques, comme un rapport entre la concentration de l'élément et la concentration du carbone. Comme le carbone, C, est généralement l'élément le plus abondant dans des matériaux organiques, il devient la référence à partir de laquelle les autres éléments sont comparés, particulièrement utile pour comparer différents échantillons. Toutefois, dans le cadre des polymères-plasma et autres revêtements étudiés ici, il est possible de créer des matériaux riches en azote, où la concentration de carbone, [C], n'est plus nécessairement plus élevée que celle des autres éléments, par exemple N. [C] n'est donc plus une bonne référence et c'est pourquoi la plupart des mesures sont présentées ici en rapport avec la totalité des éléments détectés au XPS (qui sont, dans ce projet, C, N, O et F) :

$$[E](\text{at. \%}) = \frac{[E]}{[C] + [N] + [O] + [F]} \times 100 \quad (2.2)$$

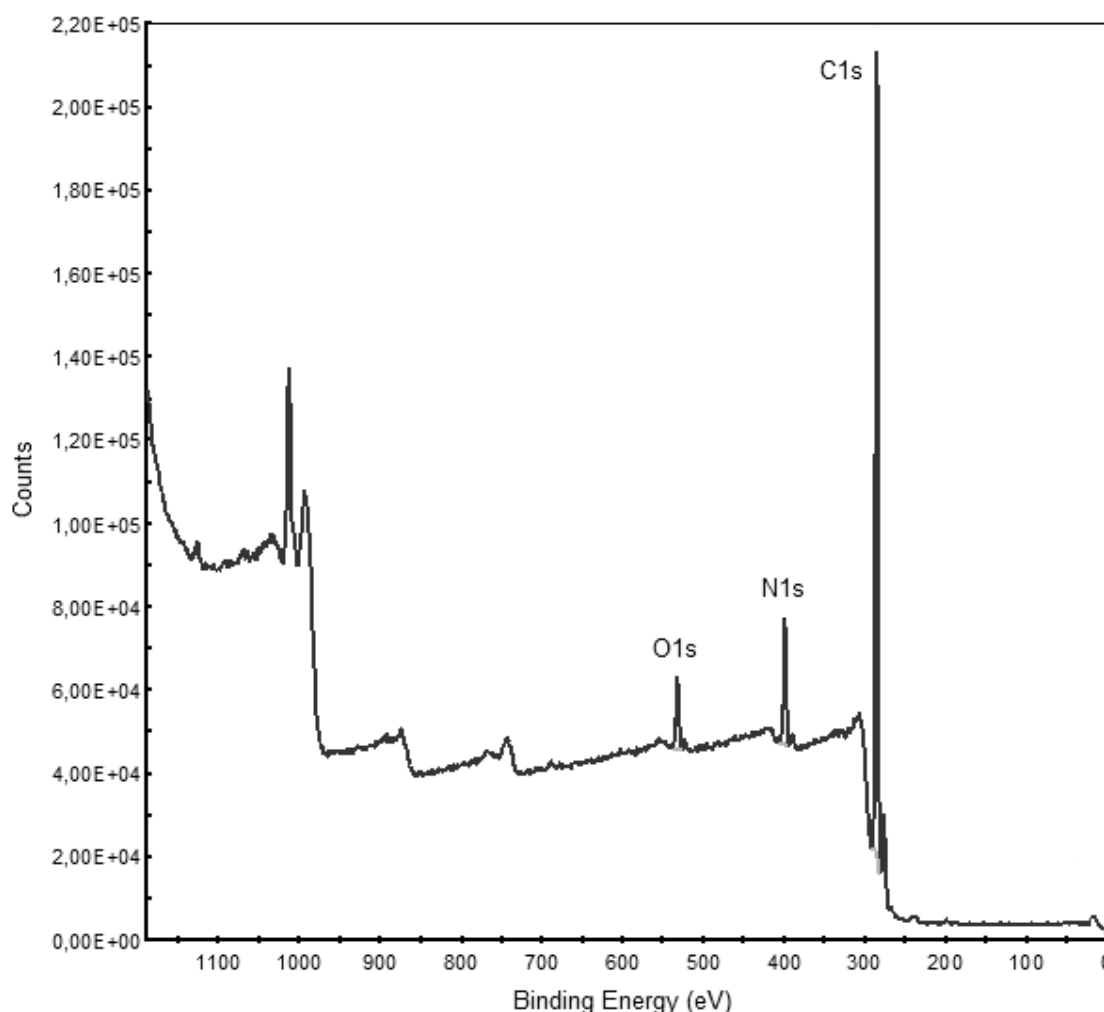


Figure 2-5: Spectre XPS de type survol (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie $MgK\alpha$) effectué sur un échantillon d'UV-PE:N de 200 nm sur c-Si, $R = 0,75$. On peut observer les différents pics d'énergie de liaison correspondants aux différents éléments (C, N et O). L'aire sous la courbe de chacun des pics est reliée à la concentration de l'élément.

L'énergie de liaison E_b varie également selon les liaisons que l'élément en question effectue avec d'autres éléments. Ainsi, chacun des pics XPS correspondant à un élément est en réalité composé de plusieurs sous-pics décalés légèrement les uns des autres. Le pic de C correspond, par exemple, aux liaisons qu'il effectue avec lui-même ou les autres éléments (N, O, etc.) présents dans l'échantillon (C-C, C=C, C-N, C-N=O, C-O, etc.). En préparant un spectre haute résolution sur chacun des pics principaux, il est possible de déconvoluer ces pics et de trouver la contribution de chaque type de liaisons et, ainsi, déterminer les groupements fonctionnels présents. Cette déconvolution se base sur plusieurs éléments *a priori* connus et tabulés, tels que la

position en énergie des liaisons possibles (le pic C-C est situé à 285,0 eV et le pic C-N est situé à 285,8 eV), largeur à mi-hauteur typique des pics et une estimation préalable des liaisons présentes. Finalement, la concentration des liaisons identifiées pour un élément (la liaison C-N du carbone) doit correspondre à la concentration des liaisons de l'élément correspondant (la liaison N-C de l'azote). Cette déconvolution peut toutefois être complexe, voire impossible, si les sous-pics ne sont pas suffisamment séparés en énergie et se chevauchent [73]. Les Figure 2-6 et Figure 2-7 représentent deux spectres haute résolution d'azote provenant d'un échantillon de Parylène diX AM. Sur la Figure 2-6, il est aisé d'identifier deux sous-pics alors que sur la Figure 2-7, il est possible de déconvoluer le pic en trois sous-pic, en assumant que l'azote effectue plus d'un type de liaison. Cependant, le degré de confiance envers ce résultat n'est pas aussi grand que pour la Figure 2-6 en raison du chevauchement des sous-pics à la Figure 2-7.

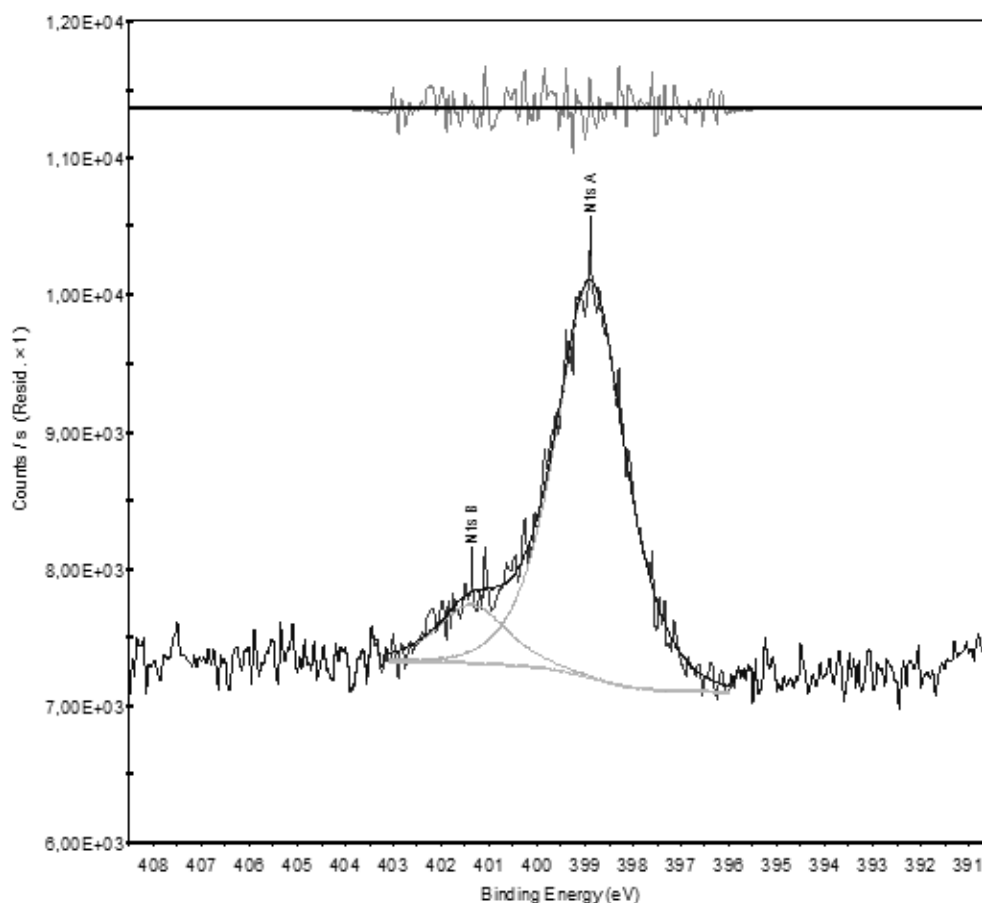


Figure 2-6: Spectre XPS de haute résolution (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie MgK α) sur le pic correspondant à l'azote d'un échantillon de Parylène diX AM tel que déposé. La courbe de la partie supérieure du graphique représente l'erreur commise par la modélisation.

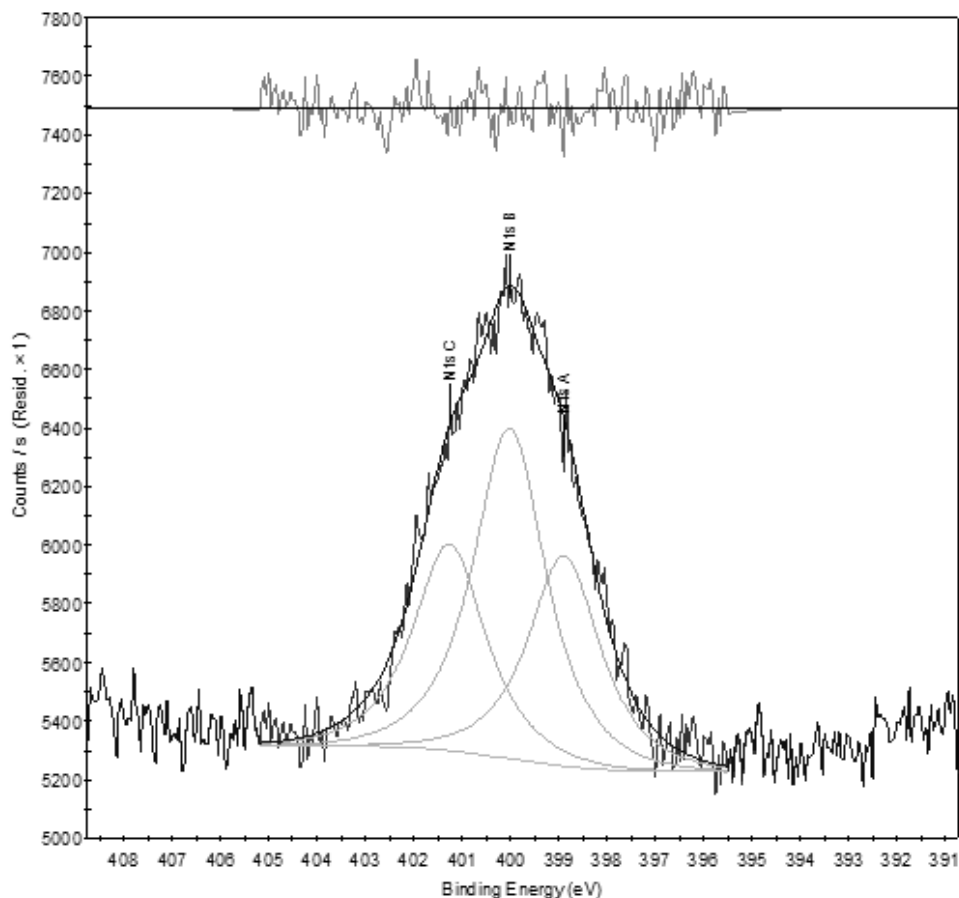


Figure 2-7: Spectre XPS de haute résolution (cible Mg, 18 mA et 12 kV; raie $MgK\alpha$) sur le pic correspondant à l'azote d'un échantillon de Parylène diX AM en contact avec l'air ambiant pendant 22 jours. La courbe de la partie supérieure du graphique représente l'erreur commise par la modélisation.

2.2.2 Dérivation chimique

La dérivation chimique permet de déterminer la concentration d'un groupement fonctionnel particulier présent à la surface de l'échantillon. Elle est particulièrement intéressante dans les cas où la déconvolution XPS haute résolution est difficile et lorsqu'il est important de connaître cette concentration. La technique se base sur l'utilisation de marqueurs chimiques se liant sélectivement au groupement fonctionnel en question. Il existe bon nombre de ces marqueurs pour détecter divers groupements fonctionnels. Dans ce projet, le marqueur utilisé est le 4-(trifluorométhyl)benzaldehyde (TFBA), puisqu'il se lie très sélectivement aux amines primaires ($R-NH_2$), tel qu'illustré à la Figure 2-8. Il est aussi facilement détectable et quantifiable par XPS

puisqu'il ajoute trois atomes de fluor par groupement R-NH₂; le fluor n'étant évidemment pas présent dans les divers revêtements considérés dans ce projet.

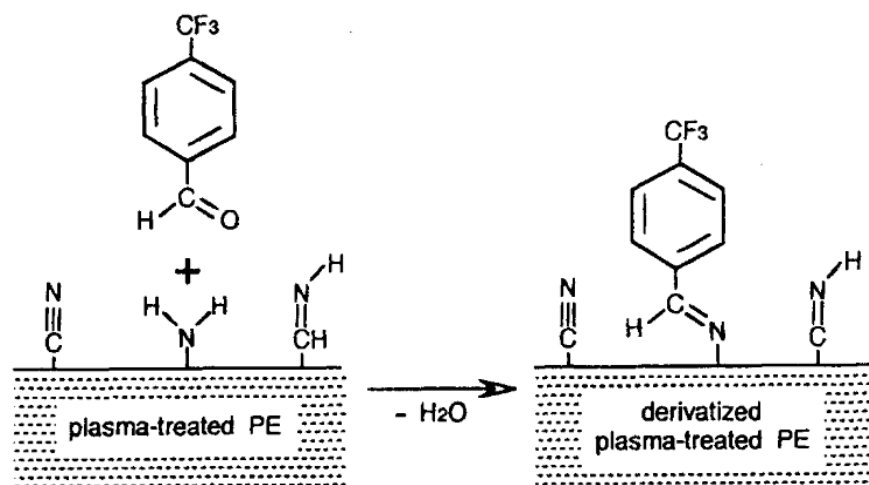


Figure 2-8: Réaction de dérivation des groupements R-NH₂ avec le TFBA, ajoutant trois fluors par groupement R-NH₂ (illustré ici sur un film de PE traité par plasma) [74], reproduite avec permission.

Pour mesurer [NH₂], un premier spectre XPS est acquis avant toute dérivation, permettant de mesurer la concentration de chacun des éléments à la surface, soit typiquement [C]_u, [N]_u et [O]_u. L'indice « u » désigne un échantillon non dérivé (*underivatized*). L'échantillon est par la suite placé sur une lamelle de verre, elle-même placée sur un lit de 1 cm d'épaisseur de billes de verre (2 mm de diamètre) dans un contenant en verre. Quatre gouttes de TFBA sont déposées délicatement sur les billes, sans toucher l'échantillon. Le contenant est fermé hermétiquement et placé dans un four à 45 °C pendant 3 h pour assurer une réaction complète de tous les groupements R-NH₂ présents. Un deuxième spectre XPS est alors acquis après dérivation (d'où l'indice « d ») pour mesurer [C]_d, [N]_d, [O]_d et [F]_d, le fluor provenant du TFBA (Figure 2-8) [42].

Tel que mentionné plus haut, trois fluors sont ajoutés pour chaque groupement R-NH₂. La mesure $\frac{[F]_d}{3}$ correspond donc à [NH₂]_u. Les concentrations relatives [O] et [C] sont elles aussi modifiées par la réaction avec le TFBA, mais ce n'est pas le cas de [N] puisque le nombre d'atomes N à la surface ne change pas en cours de dérivation. Il suffit donc de diviser par [N]_d pour obtenir la « sélectivité » en amines primaires du dépôt :

$$\frac{[NH_2]_u}{[N]_u} = \frac{[F]_d}{3[N]_d} \times 100 \quad (2.3)$$

Il est également intéressant de considérer les équations suivantes :

$$[\text{NH}_2]_u = \frac{[\text{F}]_d}{3[\text{N}]_d} \times [\text{N}]_u \times 100 \quad (2.4)$$

$$\frac{[\text{NH}_2]_u}{[\text{C}]_u} = \frac{[\text{F}]_d}{3[\text{N}]_d} \times \frac{[\text{N}]_u}{[\text{C}]_u} \times 100 \quad (2.5)$$

où l'équation 2.5 désigne le nombre de groupements R-NH₂ par 100 atomes de C [42].

2.2.3 Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation optique qui permet de mesurer plusieurs paramètres intéressants d'un dépôt mince de façon non-destructive, tels que son épaisseur, son indice de réfraction et sa rugosité de surface. Elle se base sur le fait que la lumière change de polarisation lors d'une réflexion (ou d'une transmission) sur la surface d'un second solide [75]. Ainsi, un faisceau lumineux de polarisation connue est dirigé vers l'échantillon à un angle donné, la lumière est réfléchi et le nouvel état de la polarisation résultante est mesuré par un analyseur et un détecteur. Ce dernier mesure également l'intensité de la lumière réfléchi. L'ellipsométrie à une seule longueur d'onde utilise une source lumineuse monochromatique, tandis que l'ellipsométrie spectroscopique (S.E.) (utilisée pour ce projet) fait appel à une source blanche. La méthode S.E. fournit donc de l'information sur le changement de polarisation en fonction de la longueur d'onde, permettant de mesurer encore plus de propriétés physiques de l'échantillon sous étude.

La polarisation initiale du faisceau lumineux peut être rectiligne, circulaire ou elliptique. Pour la représenter, le champ électrique est décomposé selon les coordonnées parallèle (p) et perpendiculaire (s) à la surface de l'échantillon. La Figure 2-9 présente une onde incidente polarisée linéairement où les deux composantes, A_p et A_s sont représentées. Ces dernières réagissent différemment lors de la réflexion sur l'échantillon et présentent un changement d'amplitude et de phase différents. La polarisation résultante après réflexion (r) est donc généralement elliptique. La différence d'amplitude entre B_p et B_s est notée Ψ et la différence de phase est notée Δ .

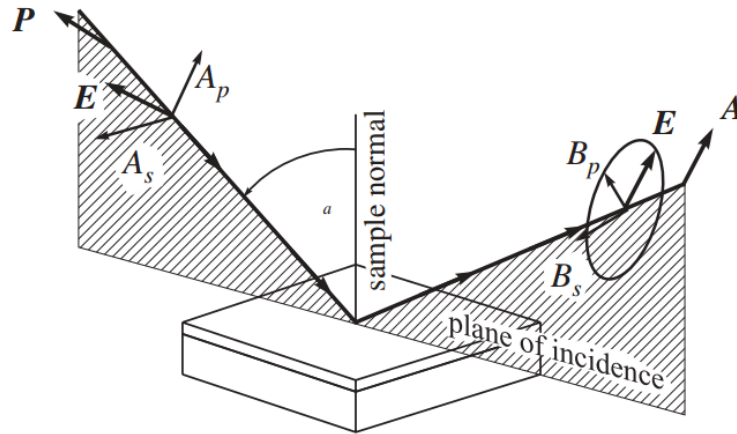


Figure 2-9: Principe de fonctionnement de l'ellipsométrie [76], reproduite avec permission.

Lorsqu'un faisceau lumineux frappe un échantillon composé d'une ou plusieurs couches minces, le faisceau est réfléchi sur chacune des interfaces, tel que représenté à la Figure 2-10. Puisque la lumière réfléchie par l'échantillon dépend de son épaisseur, l'ellipsométrie permet aussi d'étudier ses propriétés en fonction de la profondeur sous la surface. Sur un spectre typique de S.E., la région à faible énergie (grand λ), permet de mesurer l'épaisseur du dépôt en raison du patron d'interférences créées par les multiples réflexions sur les diverses interfaces représentées à la Figure 2-10. Dans la région à haute énergie (faible λ), l'absorption de la lumière par le dépôt augmente et la profondeur de pénétration diminue graduellement. L'information tirée de cette région donne accès à la rugosité de surface ainsi qu'aux propriétés optiques, telles que l'indice de réfraction n et le coefficient d'extinction k [75].

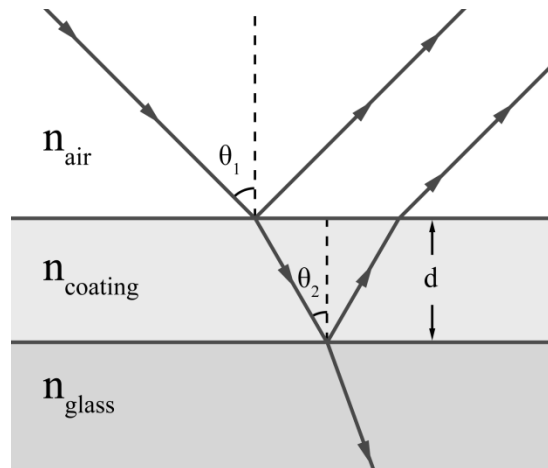


Figure 2-10: Tracé d'un faisceau lumineux dans un modèle représentant une couche mince (*coating*) déposée sur un substrat de verre (*glass*) [77], reproduite avec permission.

Il n'est toutefois généralement pas possible de calculer les propriétés optiques d'un échantillon directement à partir de Ψ et Δ . C'est pourquoi un modèle numérique de l'échantillon doit être postulé. L'utilisateur doit donc préciser une hypothèse du nombre de couches qui composent l'échantillon, la nature de ces couches et l'épaisseur approximative au logiciel d'analyse. Celui-ci produit alors une simulation des résultats obtenus pour ce modèle hypothétique. Les paramètres du modèle sont par la suite optimisés jusqu'à ce que les résultats calculés concordent aux résultats expérimentaux. Dans le logiciel utilisé pour ce projet, l'optimisation se fait en réduisant l'erreur quadratique moyenne au minimum.

Étant donné que les différentes couches composant l'échantillon sont détectées par un saut d'indice de réfraction, un substrat possédant le même indice de réfraction que la couche à étudier empêchera l'étude de la couche d'intérêt. Il est ainsi essentiel de bien choisir le substrat. Pour ce projet, le c-Si est choisi. Tous les résultats S.E. de ce projet sont obtenus à l'aide d'un ellipsomètre spectroscopique (300 à 1 600 nm) à angle fixe de 60 ° (M-2000FI) de J.A. Woollam Co, Inc. (Lincoln, USA). Le modèle composé d'une couche de silicium et de la couche étudiée est analysé par le logiciel CompleteEase v4.48.

2.2.4 Amplification en chaîne par polymérase en temps réel

Dans le cadre des expériences de culture cellulaire, l'expression génétique (voir la définition à la section 1.3.1) des cellules adhérentes sur les revêtements est étudiée. L'amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR) en temps réel est une technique qui permet, entre autres, de quantifier l'expression génétique d'un gène lors de la culture cellulaire. En résumé, elle permet de transformer les brins ARNm produits par les cellules en acide désoxyribonucléique (ADN), puis de copier cet ADN suffisamment de fois pour le rendre détectable.

L'ADN est formé d'une suite de nucléotides, chacun d'entre eux étant composé d'un groupement phosphate, d'un sucre, le désoxyribose, et d'une base azotée. Il existe quatre types de bases azotées : l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine. L'ordre de ces dernières dans un brin d'ADN permet de coder le génome d'un organisme vivant. L'ADN est formé de deux brins complémentaires en double hélice en raison des liaisons hydrogène seulement possible pour deux combinaisons de bases; l'adénine peut seulement s'apparier avec la thymine et la guanine avec la cytosine. La dénaturation de l'ADN signifie que les liaisons hydrogène entre les bases azotées

complémentaires sont rompues et que les deux brins sont séparés. L'hybridation est le contraire de la dénaturation; elle consiste à refaire les liaisons hydrogène entre les bases azotées complémentaires [78].

L'unité de l'ARN a presque la même structure de base que l'ADN, c'est-à-dire qu'elle est composée d'un groupement phosphate, d'un sucre, le ribose, et d'une base azotée. La différence avec l'ADN réside dans le fait que l'ARN possède une base azotée nommée uracile au lieu de la thymine. L'ARN ne forme généralement pas de double hélice, contrairement à l'ADN; il est souvent retrouvé sous la forme de simple brin. Il existe plusieurs types d'ARN qui sont utilisés par les cellules afin d'effectuer différentes tâches. L'ARN messager (ARNm) est le résultat de la transcription de l'ADN. Au cours de la transcription, déclenchée par divers facteurs présents dans la cellule, l'ARN polymérase se lie à l'ADN qui doit être transcrit et sépare les deux brins sur une courte distance. Elle synthétise ensuite l'ARN messager dans le noyau de façon à ce que les bases du brin d'ARNm soit complémentaires à celles du brin matrice formé d'ADN. Dans le cytoplasme, un ribosome traduit l'ARNm de telle sorte qu'une chaîne d'acides aminés est fabriquée. La séquence des acides aminés est déterminée par la séquence des nucléotides de l'ARNm; chaque groupe de 3 nucléotides correspond à un acide aminé en particulier. Le repliement de la séquence d'acide aminée forme finalement la protéine voulue. La présence d'un brin d'ARNm représente donc l'expression d'un gène particulier par la cellule. C'est pourquoi ils sont utilisés afin de quantifier l'expression des gènes. Toutefois, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) nécessite l'utilisation de brins d'ADN, et non de brins d'ARN. Une enzyme nommée transcriptase inverse est utilisée pour produire un brin d'ADN complémentaire (ADNc) au brin d'ARNm. Lorsque cette étape est effectuée avant la PCR, on nomme celle-ci RT-PCR [78].

La PCR est une technique qui permet d'amplifier jusqu'à un milliard de fois le nombre de brins d'ADN ou d'ADNc présents dans une solution, même si la concentration de ces derniers est très faible. La PCR se base sur le fait que chaque type de protéines possède une température à laquelle elles sont le plus efficaces. L'activité enzymatique des protéines peut donc être contrôlée grâce à des changements de température. La première étape de la PCR consiste à mettre dans une solution les brins d'ADNc à amplifier, la polymérase Taq (polymérase résistante à la température de dénaturation de 95 °C), des nucléotides libres ainsi que des amorces (*primers*) correspondant à la séquence que l'on veut amplifier et servant de point de départ à la synthèse (voir Figure 2-11).

Ensuite, la température de la solution est typiquement élevée à une valeur de l'ordre de 95 °C pendant la phase de dénaturation afin de dénaturer les brins d'ADNc. Par la suite, la température est diminuée à environ 60 °C pour permettre aux amorces de se lier avec les ADNc et à la polymérase de se lier à ce complexe. Cette température leur est thermodynamiquement favorable pour cette liaison. Ensuite, la température est typiquement augmentée à 72 °C, valeur qui permet à la polymérase de synthétiser le brin d'ADN grâce aux nucléotides présents dans la solution. Ces quelques étapes représentent un cycle de transition de température. En répétant ce cycle plusieurs fois, l'amplification augmente de façon exponentielle tant que des nucléotides, des amorces et des polymérases sont disponibles. Les amplicons (*amplimers*), les brins d'ADNc ainsi produits, sont ensuite généralement analysés sur un gel d'agarose pour déterminer leur taille. Toutefois, cette méthode ne permet pas de mesurer quantitativement et précisément l'expression génétique d'un gène d'une cellule. [78].

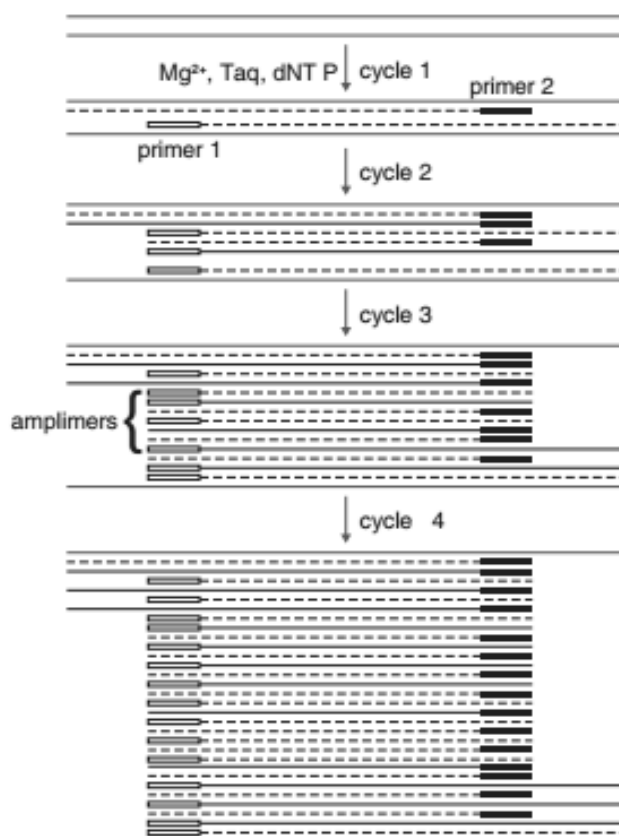


Figure 2-11: Principe de fonctionnement de l'amplification en chaîne par polymérase [79], reproduite avec permission.

La PCR en temps réel quantitative (qPCR) permet de quantifier cette expression. Au lieu de détecter l'ADNc amplifié à la toute fin de la PCR, la qPCR détecte au fur et à mesure la production d'ADNc en utilisant un marqueur fluorescent en présence d'ADN à double brin (le produit de la PCR). Le marqueur utilisé dans ce projet est le *SYBR[®] Green I*. C'est un fluorophore vert faisant partie de la famille des cyanines asymétriques se liant préférentiellement à l'ADN double brin. La longueur d'onde d'excitation maximale du complexe ADN-*SYBR[®] Green I* est environ 497 nm tandis que l'émission est centrée autour de 520 nm [80]. Une des méthodes couramment utilisées en qPCR implique de tracer sur une échelle logarithmique la fluorescence résultant de la PCR. Le tout premier point discernable (plus de 10 écarts type) par rapport au bruit de fond de la fluorescence représente le cycle seuil (C_T ou C_P , *threshold cycle ou crossing point*, deux terminologies acceptées). Ce cycle seuil est proportionnel à la quantité de doubles brins d'ADN produit par la PCR. Il suffit ensuite de comparer ce cycle seuil à celui obtenu pour une solution contrôle (solution sans ARNm) ainsi qu'à celui obtenu pour un gène de référence qui est exprimé également dans toutes les cellules.

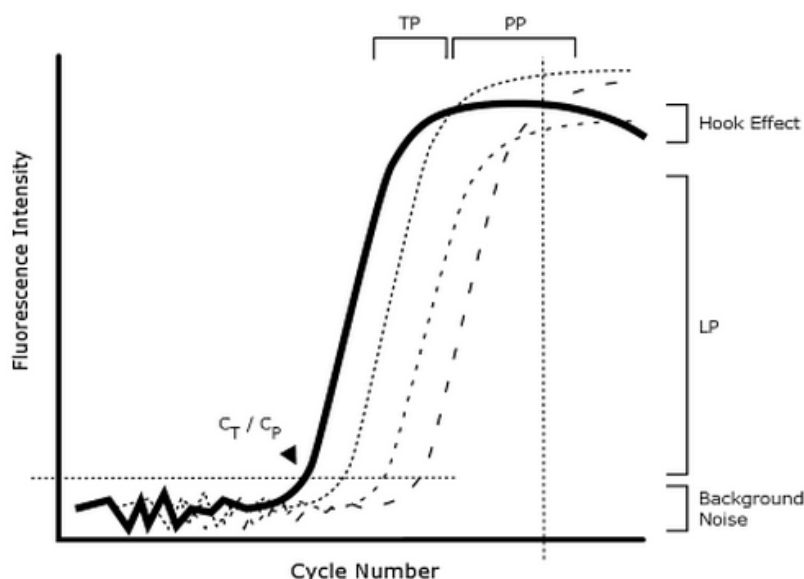


Figure 2-12: Courbe typique de PCR en temps réel. C_T/C_P représentent le cycle où la fluorescence est détectable, LP représente la phase linéaire logarithmique, TP représente la phase de transition et PP représente la phase plateau. Les courbes pointillées correspondent à des concentrations de plus en plus faible, résultant en une augmentation de la valeur du cycle seuil [81], reproduite avec permission.

Les différents cycles seuil sont déterminés par le logiciel LightCycler v3.3 (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse). Le ratio relatif d'expression d'un gène par rapport au gène de référence est déterminé par l'équation suivante :

$$\begin{aligned} \text{Ratio relatif} &= \frac{(E_{\text{gène}})^{C_P(\text{contrôle du gène étudié}) - C_P(\text{échantillon du gène étudié})}}{(E_{\text{référence}})^{C_P(\text{contrôle du gène référence}) - C_P(\text{échantillon du gène référence})}} \\ &= \frac{(E_{\text{gène}})^{\Delta C_P^{\text{gène}}(\text{contrôle-échantillon})}}{(E_{\text{référence}})^{\Delta C_P^{\text{référence}}(\text{contrôle-échantillon})}} \end{aligned} \quad (2.6)$$

où $E_{\text{gène}}$ et $E_{\text{référence}}$ sont l'efficacité qPCR de la transcription de ces deux gènes (soit environ 2 [82]).

2.3 Expériences

2.3.1 Stabilité des revêtements dans l'air

Lors de cette expérience, le vieillissement, changement temporel de la composition chimique, de l'UV-PE:N ($R = 0,75$ et $R = 1$) déposé sur du Kapton[®] (50 μm) et du parylène diX AM déposé sur du BOPP, les deux au contact de l'air ambiant, est étudiée à l'aide du XPS et de la dérivation chimique. Les durées de dépôt des UV-PE:N $R = 0,75$ et $R = 1$ sont de 4,5 h et 7 h, respectivement, résultant en un dépôt d'environ 30 nm en épaisseur. Deux dépôts pour chacun des ratios sont étudiés. Pour ce faire, des échantillons de chacun de ces revêtements sont laissés en contact avec l'air ambiant dans l'obscurité pendant plusieurs jours. De façon régulière (presque journalière), des morceaux d'échantillons sont récupérés et leur composition surfacique est déterminée par analyses XPS avant et après dérivation chimique par le TFBA. Les conditions expérimentales détaillées sont présentées à la section 3.2.3.1.

2.3.2 Stabilité des revêtements dans l'eau

Cette expérience a pour but de déterminer la stabilité (solubilité) de l'UV-PE:N ($R = 0,75$ et $R = 1$) déposé sur c-Si immergé dans un milieu aqueux. Le c-Si est utilisé afin de faciliter les mesures ellipsométriques. Deux caractéristiques sont analysées, la composition et la solubilité du revêtement, et ce, sur deux dépôts différents pour chacun des ratios de gaz. Le vieillissement au contact de l'eau à température ambiante est tout d'abord étudié de façon similaire à l'expérience précédente (section 2.3.1) à la différence que les échantillons d'UV-PE:N (carrés d'un centimètre

de côté) sont placés au fond de puits rempli d'eau déionisée, à l'abri de la lumière. Après 0 h (soit tel que déposé sans contact avec l'eau), 24 h, 72 h et 168 h, les échantillons sont retirés du liquide, séchés à l'azote comprimé, puis analysés par XPS et dérivation chimique pour connaître l'évolution de la composition chimique au cours du temps. En parallèle, l'épaisseur de ces mêmes échantillons est mesurée par ellipsométrie afin de détecter une éventuelle solubilité partielle (réduction de l'épaisseur).

2.3.3 Adhésion des monocytes U937

Cette expérience a pour but de mettre des suspensions de cellules U937 en contact avec les diverses couches organiques afin de vérifier l'existence d'une concentration critique d'amines primaires, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, nécessaire à l'adhésion de ces cellules telle qu'observée par Girard-Lauriault *et al.* [9] (voir section 1.3.1). Il s'agit surtout des couches minces UV-PE:N ($R = 0,75$) déposées à l'aide du convoyeur sur Kapton[®], du parylène diX AM ainsi que du PS de plaque de culture comme contrôle négatif. 200 μl d'une suspension cellulaire de U937 dans du milieu de culture sont inoculés sur les échantillons susmentionnés placés dans des puits d'une plaque 24 puits à une concentration de 5×10^6 cellules/ml pour l'UV-PE:N ainsi qu'à une concentration de 5×10^5 cellules/ml pour le parylène. Les cellules sont par la suite incubées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 1 h; les cellules non adhérentes contenues dans le milieu de culture sont retirées délicatement par pipette, puis 1 ml de nouveau milieu est ajouté aux puits de culture. Ceci est répété une deuxième fois et, finalement, les revêtements sont observés au microscope et des images sont prises. Les conditions expérimentales détaillées sont présentées à la section 3.2.3.2.

2.3.4 Expression génétique des monocytes U937

La technique qRT-PCR (voir section 2.2.4) a par la suite été utilisée afin de déterminer de possibles modifications d'expression génétique ($\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$) reliée à l'adhésion des monocytes U937 sur l'UV-PE:N ($R = 0,75$). $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$ sont deux cytokines exprimées par ces monocytes lors d'une réponse rapide du système immunitaire et reliées à l'ostéolyse périprothétique. En raison d'un nombre insuffisant de cellules adhérentes sur le parylène diX AM, cette expérience n'a malheureusement pas pu être effectuée sur ce type de revêtement. Deux suspensions cellulaires sont tout d'abord créées à une concentration de 8×10^6 cellules/ml et 14×10^6 cellules/ml et 1,4 ml de ces suspensions est délicatement inoculé sur 7 cm^2

d'échantillons d'UV-PE:N. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 3 h et 24 h, respectivement, à 37 °C et 5 % CO₂.

L'ARN est ensuite extrait des cellules adhérentes par une suite de manipulations débutant par une lyse dans le Trizol (voir section 3.2.3.3 pour plus de détails). La pureté en ARN de la solution résultante est par la suite vérifiée en mesurant l'absorbance de la solution à 260 et 280 nm avec un spectrophotomètre. L'ARN a un maximum d'absorption à 260 nm et la tyrosine et le tryptophane (acides aminés de protéines) possèdent un pic d'absorption à 280 nm. Si le ratio de ces deux absorbances, A_{260}/A_{280} , est situé environ entre 1,8 et 2,2, la solution d'ARN peut être considérée pure et non-contaminée avec des protéines. 1 µg d'ARN isolé des cellules est ensuite transformé en ADNc par une transcription inverse.

La quantité d'ARN est mesurée par qRT-PCR. Le contrôle négatif est constitué d'une solution faite à partir d'eau distillée au lieu d'ADNc. Le gène de référence utilisé est celui produisant l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) puisqu'il est normalement produit de façon stable dans les monocytes U937. Les séquences d'amorces nécessaires à l'amplification des différents gènes impliqués sont présentées dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4: Séquence des gènes utilisés lors de la qRT-PCR [13].

Gène	Séquence	Taille du produit PCR
		paire de bases (bp)
TNF- α	Sens : ACC ACG CTC TTC TGC CTG CTG (133–153)	147
	Anti-sens : TAC AAC ATG GGC TAC AGG CTT (279–259)	
IL-1 β	Sens : ACC TAT CTT CTT CGA CAC ATG (303–323)	168
	Anti-sens : ACC ACT TGT TGC TCC ATA TCC (470–450)	
GAPDH	Sens : TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT (11–31)	181
	Anti-sens : TTC TCA GCC TTG ACG GTG CCA (171–191)	

Les différentes étapes de qPCR effectuées sont les suivantes : un premier cycle d'activation (95 °C), 50 cycles d'amplification (94 °C, 57 °C, 72 °C et une mesure de fluorescence), un cycle de courbe de fusion afin de vérifier qu'un seul gène est amplifié à la fois (95 °C et une mesure de la fluorescence en continu) et finalement un cycle de refroidissement (jusqu'à 40 °C). Les cycles seuil sont calculés par le logiciel LightCycler v3.3 (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) et le ratio

relatif des différents gènes étudiés est calculé par l'équation 2.6. Les conditions expérimentales détaillées sont présentées à la section 3.2.3.3.

2.3.5 Adhésion et croissance des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)

Dans le cadre de recherches en médecine vasculaire (voir section 1.3.2), le développement de surface de culture propice à la croissance des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) est important. Cette expérience a pour but de déterminer si l'utilisation de l'UV-PE:N déposé sur PET comme surface de culture permet une meilleure adhésion et croissance sur 6 jours des HUVEC. Pour ce faire, des HUVEC sont inoculées sur l'UV-PE:N ($R = 0,75$ et $R = 1$), le L-PPE:N ($R = 0,75$) et la gélatine porcine (0,5 % m/v) sur PS de plaque de culture (contrôle positif) et le PET (contrôle négatif). Elles sont ensuite incubées pendant 4 h pour permettre aux cellules d'adhérer aux surfaces. Le PET est utilisé comme contrôle négatif puisque les 3 dernières surfaces sont constituées d'une couche mince déposée sur PET et le L-PPE:N est utilisé comme autre contrôle positif en raison du succès de culture des HUVEC présenté par Gigout *et al.* [12]. Les cellules non-adhérées sont ensuite retirées par pipette et du milieu de culture est ajouté aux surfaces présentant les cellules adhérentes. Ces dernières sont finalement incubées pour 1, 4 ou 6 jours afin d'observer la croissance cellulaire (le milieu de culture est changé tous les deux jours).

En détail, des HUVEC (Lonza Group Ltd., Bâle, Suisse), de passages 2 à 6, sont cultivées dans un milieu de culture avec sérum (EGM2, *Endothelial Cell Growth Medium-2*, Lonza) dans une flasque revêtue de gélatine 0,5 % m/v. Les différentes surfaces mentionnées plus haut sont coupées en carrés de 1 cm^2 et déposés au fond de puits d'une plaque 24 puits. Le temps de vieillissement entre la fabrication des revêtements et l'inoculation des cellules est de 16 h, soit le temps le plus court techniquement possible. Des puits sont également recouverts de gélatine porcine stérile pour être utilisés comme contrôle positif. Tous les puits, sauf ceux de PS gélatiné, sont remplis d'éthanol 70 % v/v afin de stériliser ces surfaces pendant 5 min. L'éthanol est retiré et les surfaces sont rincées avec de l'eau stérile. Un cylindre de clonage en verre (diamètre interne de 0,8 cm) est ensuite placé dans chacun des puits afin de s'assurer que les cellules seront inoculées seulement sur les surfaces coupées en carrés et non sur le plastique qui compose les puits. Cela assure également une surface de culture identique pour tous les puits. 200 μl d'une

suspension cellulaire à une concentration de 75 000 cellules/ml (soit 15 000 cellules par puits) sont déposés délicatement dans le cylindre de clonage. Les cultures sont incubées pendant 4 h à 37 °C et 5 % CO₂. Les cylindres de clonage sont ensuite retirés et le milieu de culture est changé afin d'enlever les cellules non-adhérentes. Les cellules sont par la suite incubées pendant 1, 4 ou 6 jours afin d'observer leur croissance au cours du temps. Au terme du temps de croissance, le milieu de culture est retiré et les cellules sont colorées et fixées à l'aide de cristal violet, un colorant histologique, afin d'être observées et comptées au microscope en prenant 3 champs de vue différents situés au centre de chaque puits en photo. Chacune des conditions est testée dans 4 puits différents placés en diagonale, afin d'éviter les effets de bords, et l'expérience est répétée 3 fois.

CHAPITRE 3 ADHÉSION DES MONOCYTES U937 SUR DIFFÉRENTES SURFACES RICHES EN AMINES PRIMAIRES

3.1 Présentation de l'article

Le présent chapitre rapporte l'article scientifique écrit durant ce mémoire et publié dans la revue à comité de lecture *Plasma Processes and Polymers*, volume 9, numéro 3, pages 243 à 252 [13]. Cet article présente tout d'abord le nouveau convoyeur utilisé pour le dépôt de l'UV-PE:N. Les résultats concernant le vieillissement dans l'air de l'UV-PE:N et du parylène diX AM sont présentés. Ensuite, l'adhésion des monocytes U937 sur ces deux revêtements est rapportée. Finalement, une étude de l'expression génétique des U937 lors de l'adhésion sur l'UV-PE:N est détaillée.

Les auteurs de cet article sont Amélie St-Georges-Robillard, Juan-Carlos Ruiz, Alain Petit, Hong Tian Wang, Fackson Mwale, Bentsian Elkin, Christian Oehr, Sophie Lerouge et Michel R. Wertheimer. Ces auteurs sont membres de l'École Polytechnique de Montréal, de l'Institut Lady Davis de recherches médicales, de l'Institut Fraunhofer du génie des interfaces et biotechnologie ou du Centre de recherche du CHUM. La contribution de l'auteure au présent article représente environ 70 % et comprend la réalisation de toutes les expérimentations incluant la planification, l'organisation, l'exécution et l'analyse des résultats, la gestion du projet et la création des figures. L'article est reproduit ici avec permission. Il est à noter que les références de cet article correspondent à celles présentées à la page 69.

3.2 Adhesion of U-937 Monocytes on Different Amine-functionalised Polymer Surfaces

A. St-Georges-Robillard¹, J.C. Ruiz¹, A. Petit², H.T. Wang², F. Mwale², B. Elkin³, C. Oehr³,
S. Lerouge⁴, M.R. Wertheimer¹

¹ Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3A7

- ² Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, and Lady Davis Institute for Medical Research, 3755, Chemin de la Côte Ste-Catherine, Montreal, QC, H3T 1E2
- ³ Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Nobelstrasse 12, 70569 Stuttgart, Germany
- ⁴ Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure ÉTS, Montréal, QC, H3C 1K3, Canada, and Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

3.2.1 Abstract

Human U937 monocytes are notoriously reluctant to adhere to normally cell-adhering surfaces, for example tissue-culture poly(styrene). In earlier work, these laboratories observed that organic thin films prepared by plasma- or ultraviolet- assisted polymerisation, so-called PVP:N, did facilitate the adhesion and proliferation of U937 under the condition that the concentration of primary amines exceed a critical value, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}} \geq 4.2 \text{ at.}\%$. That criterion being satisfied by pristine Parylene diX AM, we have compared its performance with those of particular types of PVP:N, L-PPE:N and UV-PE:N. Here, we report a study of aging of these coating types in atmospheric air, then of time-dependent adhesion of U937 cells. Although there are similarities, the coatings also manifest interesting differences that so far elude detailed understanding.

3.2.2 Introduction

Novel applications of biotechnologies manifest an ever-increasing need for surfaces that permit control over a variety of cell functions, and that can provide solutions to particular challenges [1, 2]. A good example of such a challenge is the *in vitro* culture of monocytes/macrophages [3, 4]. The function of monocytes in the immune system is to replenish resident macrophages in their normal state, and in response to inflammation signals, in which case they can move quickly to sites of infection in the tissues and differentiate into macrophages in order to elicit an immune response [5]. When these cells act *in vivo*, they adhere to tissues, but analogous cell lines tend not to reproduce this behaviour on cell culture dishes, typically poly(styrene) (PS) that has been surface-modified by gas-plasma treatment [6]. Thus, the extent to which monocyte cell lines can be used for *in vitro* studies is severely limited. One possible solution involves engineered surfaces that permit greater control of the cell environment, for

example by directing cells to mimic *in vivo* behaviour. In the case of monocytes, this can open the way to numerous important types of investigations [3, 4].

Many cell types do not adhere to hydrophobic pristine polymer surfaces like PS, poly(ethylene) (PE), poly(propylene) (PP), poly(ethylene terephthalate) (PET), poly(tetrafluoroethylene) (PTFE), etc, while these polymers' chemically-modified, hydrophilic surfaces do tend to facilitate cell adhesion. For example, "Primaria"TM, PS that comprises surface-near O- and N-containing functional groups, is widely used for cell-culture [6]; its characterisation by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was presented by Koenig *et al.* [7] and was also carried out in these laboratories. However, even that material, currently considered among the best commercially-available ones, does not enable adhesion of some cell types like human U937 and THP-1 monocytes. In previous studies, we demonstrated the adhesion of U937 cells to new types of surfaces containing high nitrogen concentration, [N] [8, 9]. As mentioned above, this non-adherent cell line is used in several biomedical research applications, and it can differentiate in response to a number of stimuli to adopt characteristics of mature macrophages [8, 9].

There are numerous articles in the literature that report how specific chemical functional groups can influence surface-colonisation, differentiation, and phenotype expression by certain cell types [1, 2, 10-13]. As we and others have explained, thin film deposits that incorporate those functionalities have several important advantages over polymer surfaces to which they have merely been covalently grafted [1, 2, 14-16]. In previous communications, we presented nitrogen (N)-rich thin film materials deposited by plasma- and by vacuum ultraviolet (VUV) photo-chemical techniques, as well as their surface-chemical characterisations and selected biotechnological applications [8, 9, 15-18]. These films, here designated "PVP:N" (for "Plasma- or VUV-Polymerized N-rich" materials), were specifically designed to contain high concentrations of N-bearing functionalities such as primary amines, and they have in many instances been shown to influence cell behaviour, for example, adhesion. More specifically, regarding U937 monocytes, we showed in a recent article that these cells could be made to adhere and proliferate on PVP:N surfaces if at least one "simple" condition was met, namely that the surface-near concentration of primary amines, $[NH_2]$, exceed a certain critical value, $[NH_2]_{crit}$, 4.2 ± 0.5 (per 100 atoms measured by XPS, at.%) [9]. In a second part of that same article, we showed that the adhesion of U937 monocytes to PVP:N surfaces induces a transient expression of

cytokines, markers of macrophage activation, as well as a sustained expression of PPAR γ and ICAM-I, implicated in the adhesion and retention of monocytes.

Now, PVP:N films are not the only known amine-rich organic coatings candidates; a such material, one that is commercially available, is aminomethyl-[2-2]paracyclophane [19] (Parylene “diX AM”, Kisco Conformal Coating LLC). Its calculated value of $[N]/[C]$, 5.9 %, more than adequately satisfies the criterion for $[NH_2]_{crit}$ shown above, because 100 % of the nitrogen on the Parylene “diX AM” precursor exists in the form of primary amine (Figure 3-1).

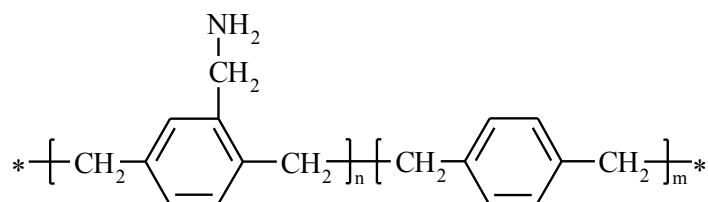


Figure 3-1: Chemical structure of Parylene diX AM. Note that on average $n = m$.

The process by which Parylene is applied to a surface, vapour deposition polymerisation, is akin to the PVP:N methodologies in several respects: The process is also carried out at room temperature, in a closed-system vacuum chamber [20], and the Parylene deposit also comprises a thin, uniform and conformal layer on any solid substrate (see Experimental Part). Parylene diX AM coatings are intended for cell-adhesion, among other applications; for example, in a recent article, Kato *et al.* [21] compared PC12 neuronal cell adhesion to tissue-culture poly(styrene) (TCPS) and to four types of Parylenes, including diX AM. They found no adhesion on conventional Parylenes (ones that do not comprise amine functionalities), but adhesiveness close to that of the standard TCPS surfaces for the case of the diX AM coating. In another recent article, Miwa *et al.* describe its use in an adhesion-based cell-separation device [22].

The objective of the work reported here has been to compare the characteristics and performance of Parylene diX AM with typical PVP:N coatings, N-doped “polymerized” ethylene deposited in a low-pressure radio-frequency glow discharge (L-PPE:N [9, 17]), or by vacuum-ultraviolet photochemistry (UV-PE:N [9, 18]). As was reported by Girard-Lauriault *et al.* [9], the latter two coating types can readily and reproducibly be prepared under conditions that lead to $[NH_2]_{crit} \geq 4.2$ at.%, so a specific objective has been to compare the adhesion of U937 cells on the Parylene, L-PPE:N and UV-PE:N surfaces under otherwise identical conditions, with the aim to

shed further light on cell-adhesion mechanisms reported by Girard-Lauriault *et al.*, if possible. Knowing that all these film types are subject to chemical aging when exposed to ambient air [17, 23], gradual reduction of $[\text{NH}_2]$ with increasing storage time, a sub-objective has also been to investigate this aging phenomenon and its possible repercussions on the adhesion of U937 cells. A final sub-objective has been to investigate whether gene-expression for U937 cells adhering to UV-PE:N is the same as the one we reported for the case of the structurally quite distinct L-PPE:N [9].

3.2.3 Experimental Part

3.2.3.1 Preparation and Characterisation of Amine-rich Coatings

All coating types, Parylene diX AM, L-PPE:N [9, 17], and UV-PE:N [9, 18], were deposited on thin polymer substrates; in the first two cases this was biaxially-oriented polypropylene (BOPP), in the latter polyimide (Kapton^(R), DuPont). Parylene coatings were prepared at the Fraunhofer Institute (“FhIGB”) in Stuttgart, the latter two at École Polytechnique in Montreal. In earlier work, we had only been able to prepare UV-PE:N as small-area (ca. 1 cm²) samples, one at a time, on account of the small MgF₂ window of our commercial Kr-discharge lamp and the static sample-holder in our VUV photochemical reactor [18]. Recently, however, we fabricated a “conveyor”-type device, Figure 3-2, which replaces the static sample holder in that same reactor chamber; this enables a continuous coating of the moving, 24 cm-long strip of Kapton, thereby increasing the area of coated substrate roughly by a factor of 24. Needless to say, this production of numerous identical samples of 1 cm² each was a prerequisite for being able to perform the cell-culture and real-time RT-PCR experiments described below. The reason why Kapton (and not BOPP) was selected as the substrate material here is that Kapton resists decomposition and degassing under the effects of VUV-irradiation, unlike many other commercial polymers, including polyolefins [24].

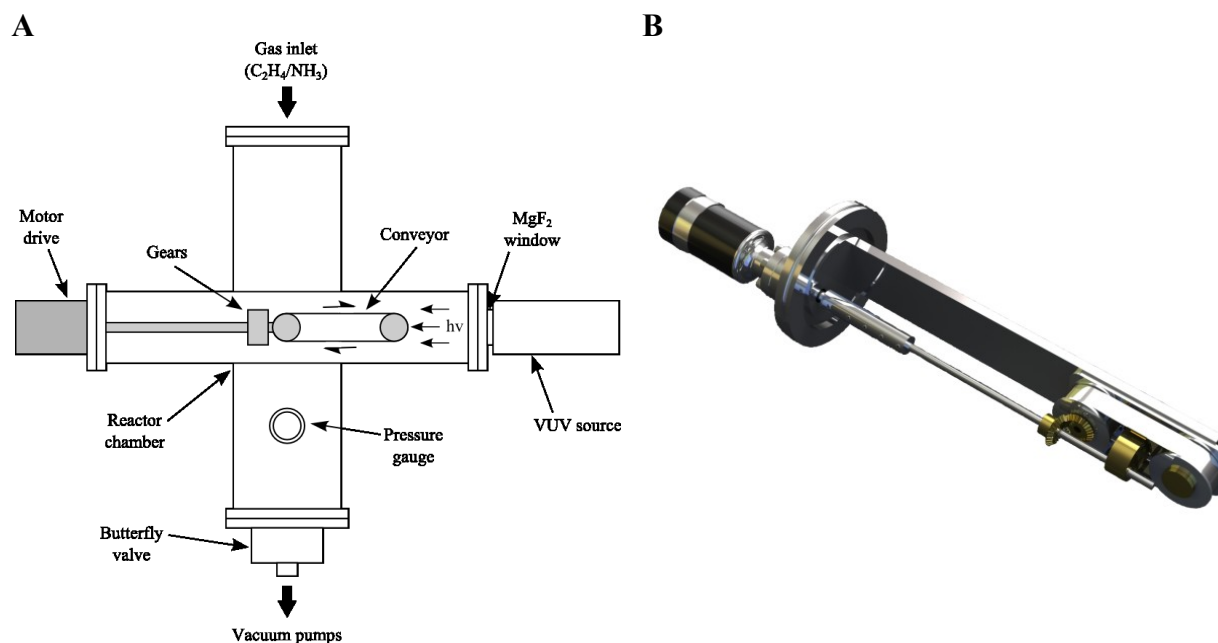


Figure 3-2: A): Schematic view of the reactor used for VUV-photo-polymerisation of thin coatings on a moving ribbon (see text); B) Conveyor-type sample holder in (A), used for applying a UV-PE:N coating on a 24 cm x 1 cm continuously-moving strip of polymer (Kapton[®] polyimide) (see text).

Regarding Parylene [19, 20], the dimer - the chemical precursor in the form of a powder - is first heated to around 130 °C and sublimates inside a vaporiser. The vapour then passes through a high temperature zone (ca. 650 °C), where it dissociates into a single diradical-monomer specie. After flowing into a deposition compartment, which contains the substrate to be coated (near ambient temperature and under vacuum), the monomer vapour condenses on the substrate's surface and polymerises, coating it with a thin, uniform and conformal layer of Parylene. The Parylene diX AM coating (ca. 0.1 µm) was deposited onto a thicker (ca. 2 µm) intermediate layer of inert Parylene C (a chlorinated variety) according to recommendation from the diX AM manufacturer. The Parylene samples were then immediately shipped to Montreal under inert gas (argon) in sealed pouches; upon receipt, they were transferred to a dessicator and stored in the dark under primary vacuum until the time of use. In order to carry out the above-mentioned aging experiments, the material was stored in laboratory air in the dark, and samples were retrieved frequently (in some instances, on a daily basis, see Results section). Following this, they underwent surface analysis by XPS before and after chemical derivatization with TFBA (trifluoromethylbenzaldehyde) [9, 25]. A 1 cm thick layer of 2 mm-diameter glass beads was

placed in a glass desiccator. Pieces of Parylene (or of the two PVP:N) samples were then placed on the glass beads after a few drops of TFBA had been dripped on the latter. The closed vessel and its content were then placed into an oven at 45 °C for 3 h. Those conditions assured that all of the primary amine groups were derivatized [9, 17, 18, 23]. Because the TFBA reaction involves fluorine, we can calculate the primary amine concentration with the following equations [17]:

$$\frac{[\text{NH}_2]_u}{[\text{C}]_u} = \frac{[\text{F}]_d[\text{N}]_u}{3[\text{N}]_d[\text{C}]_u} \times 100 \qquad \frac{[\text{NH}_2]_u}{[\text{N}]_u} = \frac{[\text{F}]_d}{3[\text{N}]_d} \times 100 \quad (3.1)$$

where the subscript *u* means underivatized (prior to derivatization), *d* means derivatized and [*X*] means the concentration of element *X*. As stated above, XPS survey (broad scan) analyses were carried out before and after derivatization in order to measure the concentrations of the different elements (C1s, N1s, O1s and F1s). Of course, the same procedures were applied to all sample materials, Parylene, L-PPE:N and UV-PE:N.

3.2.3.2 Cell Culture and Adhesion Studies

Non-adherent human U937 monocytes (ATCC, Rockville, MD) were expanded in suspension in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) high glucose supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were counted and 200 µl of cell suspension at 5×10^5 cells/ml were carefully pipetted onto 1 cm² samples of Parylene and at 5×10^6 cells/ml onto 1 cm² samples of UV-PE:N films, which had previously been placed face-up on the flat bottoms of wells in 24-well cell-culture plates. Because this had already been done earlier for the case of L-PPE:N [9], it was not repeated here. Cells were then incubated in humidified 5 % CO₂ environment at 37 °C for 1 h before careful removal of the medium. We had previously demonstrated that the maximal adhesion of U937 cells to PVP:N surfaces was reached within 1 h [8, 9], and showed that the critical primary amine concentrations ($[\text{NH}_2]_{\text{crit}} = 4.2 \pm 0.5$ at.%) was necessary for U937 cell adhesion under these conditions [9]. Non-adherent cells were then removed by gentle pipetting and fresh medium was pipetted into the wells (1 ml in each well) and again carefully removed to wash the cells. This washing procedure was repeated twice. Finally, optical photomicrographs of

the surfaces were taken (time = 1 h), and cells were incubated for a total of 24 h before additional imaging.

3.2.3.3 Gene Expression Studies

To analyze gene expression of U937 cells on UV-PE:N surfaces, cells were left to adhere for 3 and 24 h before they were collected in Trizol for further analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). To do so, cells were counted and 1.4 ml of cell suspension at 8×10^6 cells/ml was carefully pipetted onto 7 cm² samples of UV-PE:N. Cells were then incubated in humidified 5 % CO₂ environment at 37 °C for 3 h before careful removal of the medium and washing of the surface with phosphate buffered saline (PBS) to remove non-adherent cells. Then the cells were lysed with Trizol (Invitrogen, Burlington, ON). For the 24 h adhesion part, the cell concentration was 14×10^6 cells/ml.

Total RNA was extracted from adherent U937 cells lysed in Trizol following the company's procedure. Briefly, each 1 ml of Trizol was mixed vigorously with 0.2 ml of chloroform. Then, after centrifugation for 15 min at 12,000 g at 4 °C, the aqueous phase was precipitated in 1 volume of isopropanol, incubated at -20 °C for 60 min, and centrifuged again for 15 min at 12,000 g at 4 °C. The RNA pellets were then resuspended in 50 µl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. RNA concentration was assayed by measuring A₂₆₀ and RNA purity was assayed by measuring A₂₆₀/A₂₈₀.

The reverse transcription (RT) reaction was performed using 1 µg total RNA isolated from the cells. The chemicals and procedures were those from Invitrogen. Briefly, 1 µg of RNA was mixed with random primers (for a final concentration 0.15 µg/µl), dNTP mixture (0.5 mM) and DEPC-treated distilled water for a total volume of 12 µl. After the solution was incubated at 65 °C for 5 min, it was mixed with first strand buffer (for a final concentration of 1X), DTT (0.01 M), RNaseOUT and Superscript II reverse transcriptase (10 U/µl) for a final volume of 20 µl. The solution was then incubated at 42 °C for 50 minutes to perform the reaction and then at 70 °C for 15 minutes to inactivate the reverse transcriptase.

For the LightCycler real-time RT-PCR, a master mix of the following reaction components was prepared (with final concentrations as): 10 µl SYBR PCR master mix (1X) (from Qiagen), 8 µl distilled water, 0.5 µl forward primer (0.25 µM) and 0.5 µl reverse primer (0.25 µM). To these 19 µl master mix, 1 µl cDNA was mixed as PCR template. For the negative control, the master

mix was incubated with 1 µl distilled water instead of cDNA. For TNF- α , the sequence of the forward primer is ACC ACG CTC TTC TGC CTG CTG (133–153), while the sequence for reverse primer is TAC AAC ATG GGC TAC AGG CTT (259–279). The size of PCR product is 147 bp. For IL-1 β , the sequence of forward primer is ACC TAT CTT CTT CGA CAC ATG (303–323), while the sequence of reverse primer is ACC ACT TGT TGC TCC ATA TCC (450–470). The size of PCR product is 168 bp. GAPDH was applied as reference gene. The forward primer of GAPDH is TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT (11–31). The reverse primer of GAPDH is TTC TCA GCC TTG ACG GTG CCA (171–191). The PCR product size is 181 bp.

The real time PCR conditions were: one cycle of PCR initial activation step (95 °C for 15 min, 20 °C/s ramp rate), 50 cycles of amplification and quantification (94 °C for 15 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 30 s with a single fluorescence measurement), one cycle of melting curve (65–95 °C with a heating rate of 0.1 °C/sec and a continuous fluorescence measurement), and a final cooling step to 40 °C.

The crossing points (CP) were determined by the LightCycler software 3.3 (Roche Diagnostics) and were measured at constant fluorescence level. Every sample was run in triplicate and the average value was employed in the following calculations. The relative ratio of gene transcription was determined by the following equation:

$$\text{Relative ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta\text{CP}_{\text{reference}}(\text{control-sample})}} \quad (3.2)$$

where E_{target} and E_{ref} are the real-time PCR efficiencies of the target and reference genes' transcripts. Both efficiencies have numerical values close to 2 [26]. After RT-PCR, the products were collected by centrifugation and the size was analysed on 2.0 % agarose gel.

3.2.4 Results

3.2.4.1 Aging of Parylene, L-PPE:N and UV-PE:N Films

Figure 3-3A presents the results of $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ measurements on Parylene. Also shown, for each sample (i.e. same aging time) is the corresponding value of $[\text{O}]/[\text{C}]$, the oxygen concentration at the surface after the same period of aging (storage in ambient air, in the dark).

In Figure 3-3B and 3C, we show $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ and $[\text{O}]/[\text{C}]$ data for UV-PE:N samples corresponding to two different R values (R being the mixture ratio of ammonia/ethylene reagent gas flows [9, 18, 23]). In the cases of both (B) and (C), the results pertain to several nominally-identical fabrication runs with $R = 0.75$, and $R = 1.0$, respectively. The data show good reproducibility and relatively slight amounts of scatter. Contrary to Parylene diX AM and UV-PE:N (Figure 3-3A to 3C), we do not show equivalent data for L-PPE:N here, because those have recently been presented elsewhere, also for different values of R [23]. Those data, however, displayed considerably more scatter. In other words, L-PPE:N is apparently a less “well-behaved” (less reproducible) material than UV-PE:N.

The equations of the curves (solid and dotted) in Figure 3-3 were obtained by fitting the data with exponential functions, and from these the time constants, τ , were calculated; those values are shown in boxes in (A), (B) and (C). For the case of Parylene (Figure 3-3A) we note quite similar τ values for the decay of $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ and the rise of $[\text{O}]/[\text{C}]$, namely 9.2 and 7.8 days, respectively. However, for the cases of UV-PE:N at $R = 0.75$ and 1.0 (Figure 3-3B and 3C, respectively), we note time constants that are quite different (6.4 and 3.2 days, versus 6.2 and 3.1 days, respectively). For the cases of L-PPE:N (not shown), at $R = 0.75$ and $R = 2.5$, the τ values differed significantly (3.5 and 3.1 versus 2.4 and 7.2 days, respectively). In other words, the key parameter, τ , corresponding to decay of $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$, was shorter in both PVP:N materials than in Parylene (A), roughly a third and two thirds for L-PPE:N and UV-PE:N, respectively. For the sake of better clarity and comparison, these six sets of kinetic data are summarized in **Table 3.1**, along with other relevant characteristics of the coatings. Evidently, considering data scatter, the uncertainty in curve-fitting, and the assumption of first-order kinetics throughout (i.e. single exponentials), those values of τ are only approximations.

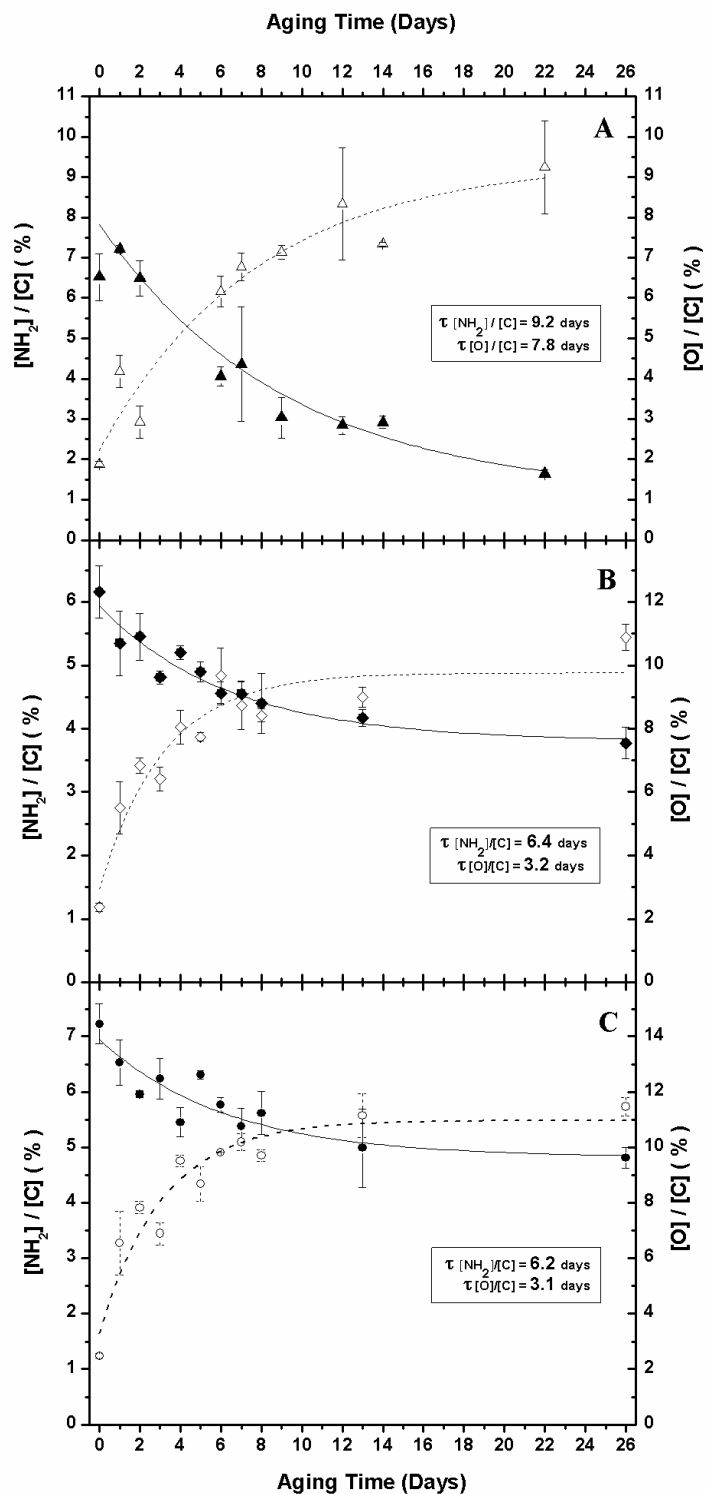


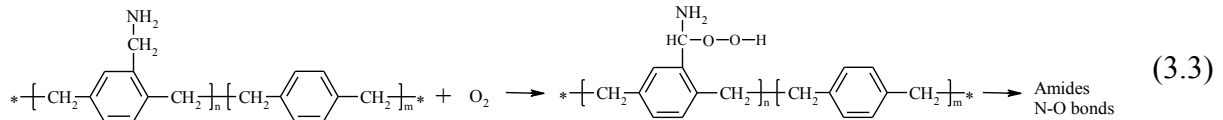
Figure 3-3: Time-evolutions of the composition of: A) Parylene diX AM; B) UV-PE:N ($R = 0.75$); and C) UV-PE:N ($R = 1$); as a function of the duration of storage in laboratory atmosphere in the dark. Open symbols represent $[O]/[C]$.

Table 3.1: Summary of kinetic data (time-constants) and chemical composition of the different coatings

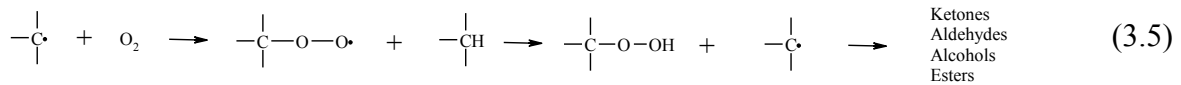
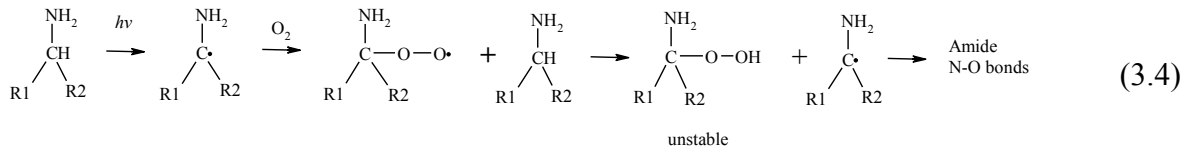
Coating Type	$\tau_{[\text{NH}_2]}$ days	$\tau_{[\text{O}]}$ days	As deposited	
			$[\text{N}]/[\text{C}]$ %	$[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ %
Parylene diX AM	9.2	7.8	6.7	6.5
UV-PE:N (0.75)	6.4	3.2	8.4	6.2
UV-PE:N (1.0)	6.2	3.1	10.9	7.2
L-PPE:N (0.75)	3.5	3.1	20.8	11.5
L-PPE:N (2.5)	2.4	7.2	77.0	30.1

Nevertheless, certain conclusions can be drawn from those comparisons, namely the following:

- (i) Parylene is an homogeneous polymer coating; the “disappearance” of each primary amine group is accompanied by the uptake of exactly one oxygen atom in the film’s chemical structure (within experimental precision of the available data). This statement is justified by the identical first-order kinetics of amine decay and oxygen take-up, with very similar time constants (see Table 3.1). A plausible reaction scheme for the observed aging via conversion of the reactive primary amines into an oxygen-bearing functionality, for example an amide group, is the following: ^[23]



- (ii) In the case of UV-PE:N and L-PPE:N coatings, similar qualitative observations can be made, but the decay and uptake processes seem to be rather more complex, with less clear-cut kinetics and correlations. In these cases, the scheme shown above is modified as follows, in agreement with a proposal by Friedrich *et al.* [27]:



Unlike Parylene, which was found to have no detectable ESR (electron-spin resonance) signal [28], plasma polymers are known to be extremely rich in trapped free radicals [29, 30]. These can react over time with oxygen from the atmosphere, as portrayed in equation (3.5).

On the basis of (i) and (ii) above, we can therefore propose the following: The “mirror image” kinetic curves of Figure 3-3A, where the total increase in $[O]/[C]$ (ca. 7 % in the course of 24 days) very nearly equaled the decrease in $[NH_2]/[C]$ (ca. 6 %), can be explained in terms uniquely associated with the oxidation of primary amines according to equation (3.3). On the other hand, Figure 3-3B and 3C show that the increases in $[O]/[C]$ (ca. 9 % after 24 days, in both cases) significantly exceeded the drops in $[NH_2]/[C]$ (ca. 2.5 % in both cases). This is attributable to the fact that we are facing not only the oxidation reactions of primary amines (equation (3.4)), but also those involving free radicals (equation (3.5)), which occur in parallel - probably with different kinetics. Therefore, in the latter case, the single exponential fit is admittedly likely to be a rather crude approximation, albeit useful for this present discussion of the experimental observations. In the case of data pertaining to L-PPE:N (not shown here, but in [23]), the same qualitative remarks apply as in the case of the UV-PE:N films.

3.2.4.2 Adhesion of U937 Monocytes on Parylene Films

As already mentioned, we have elsewhere [9] reported the existence of a critical primary amine concentration, $[NH_2]_{crit} = 4.2 \pm 0.5$ at.%, necessary for the adhesion of U937 cells to PVP:N surfaces. Figure 3-3A clearly shows that pristine Parylene diX AM more than adequately satisfies this condition, because when we take in account that $[C]$ equals 91.7 at.%, the measured value of $[NH_2]$ is 6.0 ± 0.5 at.%; furthermore, it continues to exceed $[NH_2]_{crit}$ during several days of aging in atmosphere. Figure 3-4 presents micrographs corresponding to a series of surfaces after 1 h of culture of U937 cells under the conditions described in the Cell Culture and Adhesion Studies section above. Indeed, Figure 3-4A shows that U937 cells adhered to the “pristine” surface ($[NH_2] \sim 6$ at.%). However, Figure 3-4B and 4C, corresponding to Parylene diX AM surfaces that had been aged for 6 and 10 days ($[NH_2] \sim 3.5$ at.% and ~ 2.5 at.%, respectively) both show significantly reduced numbers of adhering cells, meaning that cell adhesion decreases as $[NH_2]$ decreased. Figure 3-4D portrays a regular TCPS dish as a negative control, and it shows virtually no adhesion of U937 cells. Figure 3-4E is a plot representing relative densities of adhering U937 cells in images 4A to 4C, versus the corresponding $[NH_2]$ values. Even though

there is still some adhesion when $[\text{NH}_2]$ is under $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, this very graphically confirms our previous conclusions regarding the critical role of the primary amine group in the interaction of U937 cells with bioactive surfaces.

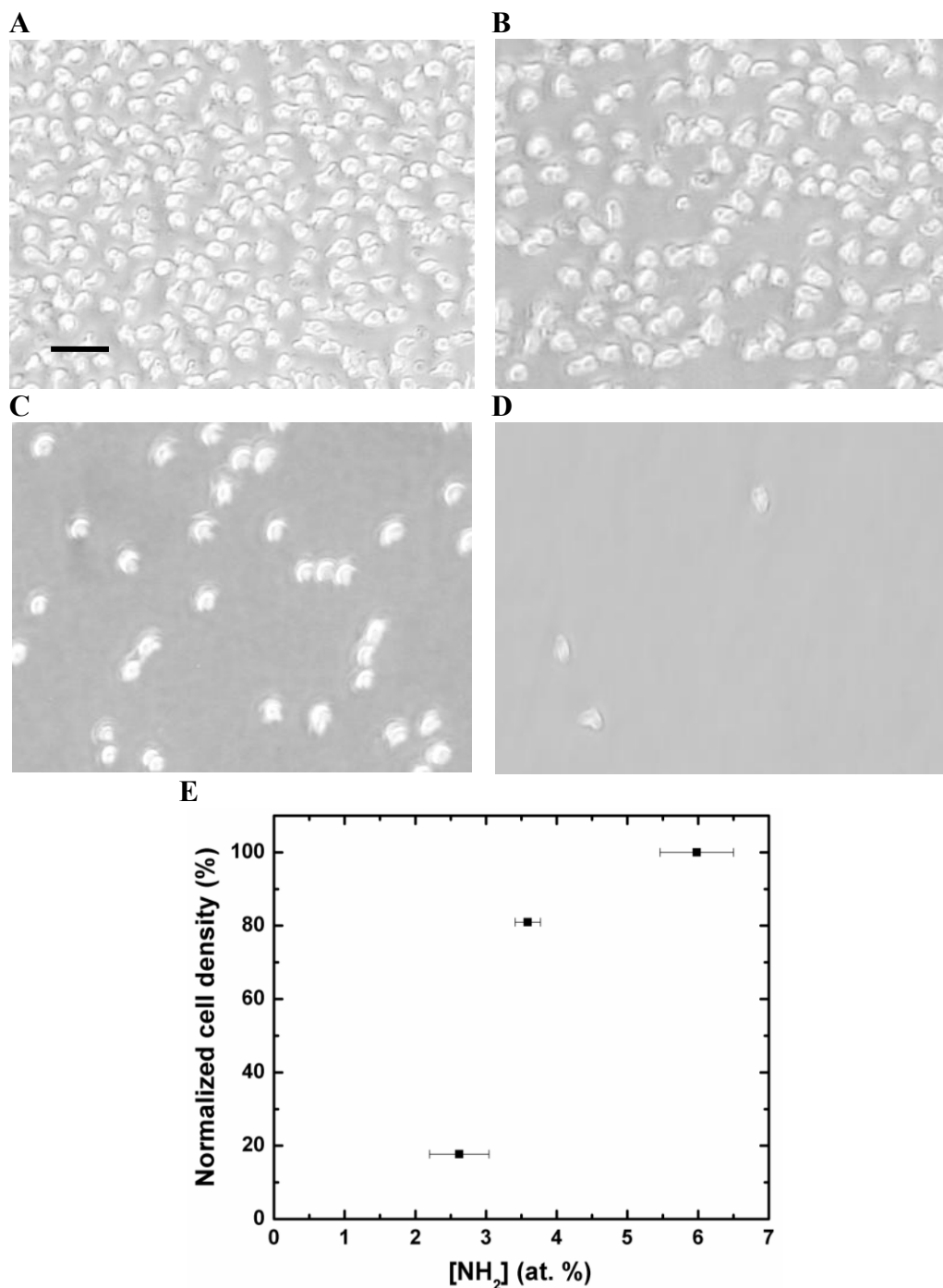


Figure 3-4: Decrease in the adhesion of U937 cells on Parylene surfaces with a decrease in $[\text{NH}_2]$ because of aging. U937 cells were applied on 1 cm² of Parylene surfaces and incubated for 1 h in

a CO₂ incubator at 37 °C, on the pristine surface (A) – [NH₂] ~ 6.0 at.%), after 6 days (B) – [NH₂] ~ 3.5 at.%), and 10 days (C) – [NH₂] 2.5 at.%) of aging, resulting from exposure to atmospheric air in the dark. Surfaces were then gently washed with medium and pictures were taken. Cells on regular polystyrene Petri dish (D) served as negative control. Note the decrease in cell adhesion with decreasing [NH₂] resulting from the aging in laboratory air. E): Cell density of U937 on Parylene as a function of primary amine concentration, corresponding to A, B, and C above; values are normalized with respect to pristine Parylene (\equiv 100 %), image A. Scale bar: 10 μ m.

Figure 3-5, which illustrates the adhesion of U937 cells on Parylene surfaces after 1 h and 24 h in culture, is designed to test the potential of these surfaces not only for adhesion, but also for the longer-term growth (proliferation). Results show that the cell density decreased with time, suggesting that Parylene does not favour retention and growth of U937 cells, unlike PVP:N substrates. Possible reasons for this remain to be investigated; unlike in the case of work reported by Girard-Lauriault *et al.* [9], this precluded studies of gene expression (cytokines, PPAR γ and ICAM-I) due to the loss of cells with time in culture.

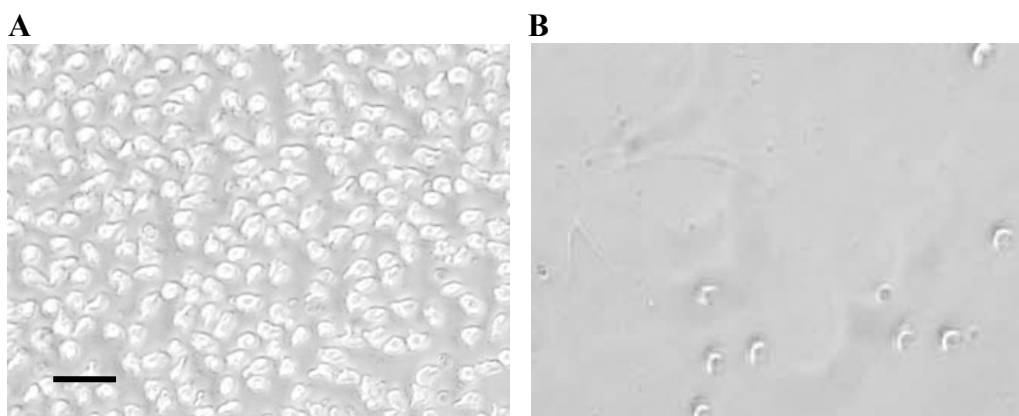


Figure 3-5: Adhesion of U937 cells on Parylene diX AM films as a function of time in media. U937 cells were applied on 1 cm² Parylene surfaces and incubated for 1 h in CO₂ incubator at 37 °C. Surfaces were then washed with medium, and pictures were taken. A): Cells were incubated for 1 h on the pristine Parylene surface ([NH₂] ~ 6.0 at.%) (see also Figure 3-4A); B): cells were then cultured on the same surface for a total of 24 h, during which significant detachment of cells may be noted to have occurred. Scale bar: 10 μ m.

3.2.4.3 Adhesion and Gene Expression of U937 Monocytes on UV-PE:N Films

Figure 3-6A and 6B are micrographs illustrating adhesion as a function of time in media of U937 cells on UV-PE:N ($R = 0.75$) films that had been aged for 1 day ($[\text{NH}_2] \sim 4.5$ at.%). A cell adhesion test was also performed in a UV-PE:N sample that was aged 19 days ($[\text{NH}_2] \sim 3.4$ at.%) and no adhesion was observed. In Figure 3-6A, the cells were incubated for 1 h on the UV-PE:N film; in Figure 3-6B, cells were then cultured on the same surface for a total of 24 h, during which their retention evidently persisted, contrary to the case of Parylene (see Figure 3-5).

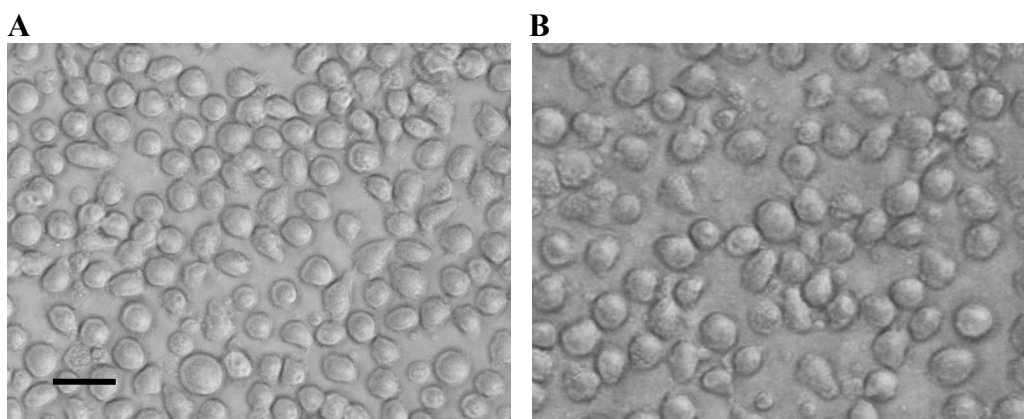


Figure 3-6: Adhesion of U937 cells on UV-PE:N ($R = 0.75$) films as a function of time in media. U937 cells were applied on 1 cm^2 UV-PE:N surfaces and incubated for 1 h in CO_2 incubator at 37°C . Surfaces were then washed with medium, and pictures were taken. A): Cells were incubated for 1 h on the UV-PE:N film ($[\text{NH}_2] \sim 4.5$ at.%); B): cells were then cultured on the same surface for a total of 24 h, during which retention of cells evidently persisted, contrary to the case of Parylene (see Figure 3-5). Scale bar: $10 \mu\text{m}$.

In view of that persistent adhesion, a sub-objective of the present research has been to investigate whether gene-expression for U937 cells adhering to UV-PE:N is the same as the one reported for the case of the structurally quite distinct L-PPE:N and H-PPE:N surfaces [9]. For this purpose, quantitative RT-PCR experiments were conducted using cells that had been made to adhere on UV-PE:N ($R = 0.75$) for up to 24 h. However, unlike Girard-Lauriault *et al.*,^[9] who investigated six different genes ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{PPAR-}\gamma$, ICAM-1 , PU.1 , and Egr-1), we were content to limit the present PCR study to the first two, both cytokines. Because cytokines play a central role in the macrophage host defence [31], we investigated the effect of U937 monocyte attachment on the expression of tumour necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) and interleukin-1 beta (IL-

1 β), two cytokines secreted as part of immediate early response genes of these cells. The data describing the expression of TNF- α and IL-1 β by U937 monocytes cultured on L-PPE:N are reproduced from our previous study [9] for reference and presented with recent real-time RT-PCR results in Figure 3-7. Whereas the L-PPE:N-related data are characterized by rapid (3 h) but transient upregulation of these genes by the amine-rich surfaces [9], the new data show only minor differences between control experiments (cells in suspension) and those corresponding to U937 cells adhering to UV-PE:N, both for TNF- α and IL-1 β - compared with the respective maxima of 15 and 8 that had been observed for the case of L-PPE:N. Taken together, the data suggest that major inflammatory reactions were not induced by adhesion to PVP:N surfaces, contrary to what was observed for corrosion products of orthopaedic implants that induced the expression of TNF- α in U937 cells for at least 24 h under similar *in vitro* conditions [3].

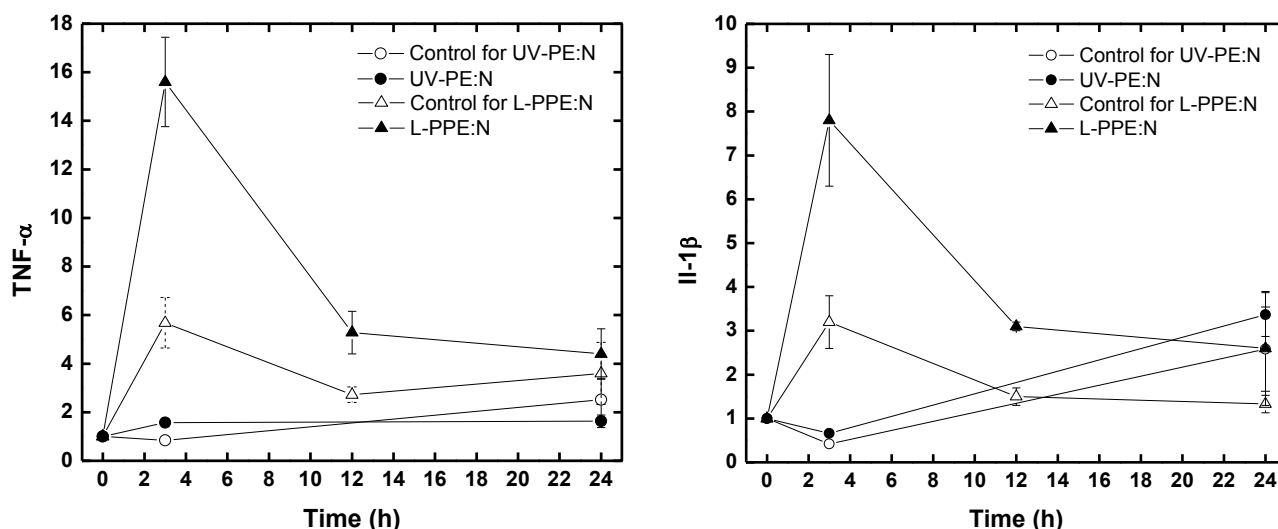


Figure 3-7: Expression of TNF- α and IL-1 β by U937 cells adhering on UV-PE:N with $[\text{NH}_2] > [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, in comparison with those adhering to L-PPE:N [9]. Ratios were calculated using equation (3.2). No major inflammatory reaction was induced by adhesion to UV-PE:N.

3.2.5 Discussion and Conclusion

We begin by noting that the measured value of $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$, $6.5 \pm 0.6 \%$, is close to the calculated one, 5.9% , based on the chemical structure of Parylene diX AM, with $m = n$ (Figure 3-1). Hence, we are confident in the validity of all arguments based on numerical values of primary amine concentrations in the present as well as in our earlier work, where identical analytical procedures were employed.

In Figure 3-3, we note qualitatively similar aging behaviours between Parylene diX AM and UV-PE:N, but quantitatively they are rather different. First, the former, by its very nature, possesses a highly reproducible structure and compositional evolution with time. In contrast, for UV-PE:N (and other members of the PVP:N family) the composition and its evolution with aging time depend on the fabrication conditions (the mixture ratio, R) of the particular coating, as seen from Figure 3-3B and 3C. The roughly 1.5-fold more rapid kinetics (1.5 times shorter time constants) in the case of UV-PE:N (a factor of three in the case of L-PPE:N) further underlines the different, more complex nature of these latter coating materials. As already pointed out above, this is most probably associated with high concentrations of trapped free radicals in PVP:N films: Oehr *et al.* [29] used electron-spin resonance (ESR) spectroscopy to measure the density of free radicals in freshly plasma-polymerized fluorocarbon films, and a typical value of 1.5×10^{20} spins/cm³ was found; it is noteworthy that this value agrees very well with those of earlier authors, found in Table 6.5, page 91 of Yasuda's book [30], several of which pertain to hydrocarbon plasma polymers. While a portion of those radicals quite rapidly recombined via a second-order (bimolecular) decay process, another fraction did not recombine within the typical (ca. 48 h) period of observations. Furthermore, temperature-dependent ESR measurements suggested much slower kinetics below the materials' glass transition temperatures, T_g . Oehr and collaborators [27] also attempted to detect free radicals in different Parylene deposits, including diX AM. However, contrary to plasma polymers or plasma-activated polymer surfaces [30], the radical concentration in Parylene was below the detection limit of their ESR equipment. Furthermore, Parylene being more crystalline than any plasma polymer, it may be expected that its molecular motions are significantly slower. These considerations all lend strong support to the chemical reaction schemes shown in equations (3.3) to (3.5) above; combined with the slower kinetics observed in the case of Parylene, these may account for all of the key features pointed out in Figure 3-3.

We now turn to the cell-biological results portrayed in Figure 3-4 to Figure 3-6, as well as in Figure 3-7. Most significantly, U937 cells were found to adhere to Parylene diX AM with $[\text{NH}_2] \geq [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, but not to TCPS. In these regards the present observations are fully in line with those reported by Girard-Lauriault *et al.* [8, 9], but there the similarities end:

- (i) Those authors found no U937 adhesion at all below $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$;
- (ii) Cells came to confluence within 1 h on any PVP:N surface above $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$;

(iii) Cells remained adherent and proliferated for more than 48 h.

In contrast, Figure 3-4C ($[\text{NH}_2] \sim 2.5\%$) suggests some minor degree of U937 adhesion after 1 h, while Figure 3-5B bears witness to substantial detachment of previously adhering cells after 24 h. Unfortunately, for this reason it was not possible to pursue RT-PCR investigations of possible monocyte-macrophage transformation, as reported by the above-named authors [9].

On the other hand, thanks to the new “conveyor”-modified VUV reactor illustrated in Figure 3-2, it is now possible to fabricate 24 cm^2 of UV-PE:N (as opposed to the former 1 cm^2) in any given deposition run. UV-PE:N [9, 18, 23], including the present “dynamic” coatings made with $R = 0.75$ and 1.0 , has a structure close to that of Parylene ($[\text{NH}_2]/[\text{N}] \sim 81\%$ vs 100% , as opposed to $< 50\%$ for L-PPE:N, and even lower for H-PPE:N). In the present experiments, this reflected in excellent and persistent adhesion of U937 cells, as observed earlier for the “static” (1 cm^2) UV-PE:N samples; in addition, gene expressions of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ (Figure 3-7) showed that adhesion of U937 cells on UV-PE:N did not induce inflammatory reactions, as reported earlier for the case of L- and H-PPE:N [9].

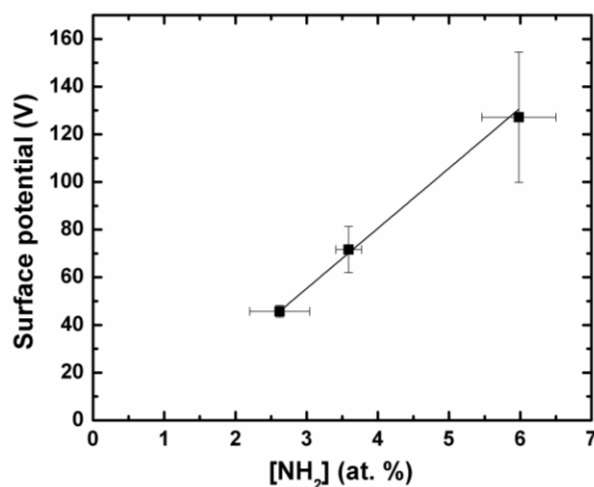


Figure 3-8: Plot of the electrostatic surface potential of humid Parylene as a function of primary amine concentration on pristine and aged samples.

The above-described differences between Parylene diX AM and all PVP:N family members may possibly be attributable to “synergistic” contributions from other functional groups to mediate interactions between the bioactive surfaces and protein adsorption, which in turn determines the integrin receptors on the U937 cell-membranes; all PVP:N coatings are known to

possess a variety of such functional groups, contrary to the case of Parylene diX AM, even after aging. Another possible explanation may be related to surface charge that also greatly influences protein adsorption: using an electrostatic voltmeter (Isoprobe, Monroe Electronics, Lyndonville N.Y.) we have recently undertaken to measure the surface potential, V , of PVP:N and Parylene diX AM surfaces [32], relating to the generation of charged species resulting from the reaction: $R - NH_2 + H_2O \rightleftharpoons R - NH_3^+ + OH^-$. While in the case of PVP:N the measured values were always quite low (a few tens of volts at most), pristine Parylene initially displayed a value of $V > +130$ V, which subsequently decayed with time to $< +50$ V, as illustrated in Figure 3-8. Because the cell-adhesion behaviour illustrated in Figure 3-4 evidently tracks with this voltage decay, it is tempting to suggest that an electrostatic effect may dominate adhesion of the (negatively-) charged proteins and cells in the case of Parylene, but this is subject to further investigations.

3.2.6 Acknowledgements

This research is being supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). MRW gratefully acknowledges support from the Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB) and from Plasma Québec. The authors are grateful to Drs. Florina Truica-Marasescu and Pierre-Luc Girard-Lauriault for their participation and for valuable discussions, to Dr. Michaela Müller for fruitful discussion, and to Mssrs. Yves Drolet and Jean Soucy for skilled technical support.

3.2.7 References

1. R. Förch, A. N. Chifen, A. Bousquet, H. L. Khor, M. Jungblut, L.-Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E.-K. Sinner, W. Knoll, *Chem. Vap. Deposition* **2007**, 13, 280.
2. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser, *Plasma Process. Polym.* **2006**, 3, 392.
3. L. Luo, A. Petit, J. Antoniou, D. J. Zukor, O. L. Huk, R. C. W. Liu, F. M. Winnik, F. Mwale, *Biomaterials* **2005**, 26, 5587.
4. Y. K. Gong, L. Luo, A. Petit, O. Huk, J. Antoniou, F. M. Winnik, F. Mwale, *J. Biomedical Material Res.* **2005**, 72A, 1.
5. N. V. Serbina, T. Jia, T. M. Hohl, E. G. Pamer, *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, 26, 421

6. P. LaRocca, S. Barker, *Cell Line* **1996**, 6, 1.
7. A. L. Koenig, V. Gambillara, D. W. Grainger, *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, 64A, 20.
8. P.-L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. Demers, P. Desjardins, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2005**, 2, 263.
9. P.-L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H. T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale, M. R. Wertheimer, *Macromol. Biosci.* **2009**, 9, 911
10. J. M. Curran, R. Chen, J. A. Hunt, *Biomaterials* **2005**, 26, 7057.
11. J. M. Curran, R. Chen, J. A. Hunt, *Biomaterials* **2006**, 27, 4783.
12. B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2004**, 25, 5947.
13. M. A. Lan, C. A. Gersbach, K. E. Michael, B. G. Keselowsky, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2005**, 26, 4523.
14. Z. H. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Foerch, R. Holcomb, D. Roitman, *Macromolecules* **2003**, 36, 7689.
15. F. Truica-Marasescu, P.-L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W. E. S. Unger, M. R. Wertheimer, *Thin Solid Films* **2008**, 516, 7406.
16. P.-L. Girard-Lauriault, P. Desjardins, A. Lippitz, W. E. S. Unger, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 631.
17. F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 44.
18. F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, 209, 1043; Erratum: **2008**, 209, 2061
19. J. Lahann, D. Klee, H. Höcker, *Macromol. Rapid Comm.* **1998**, 19, 441
20. W. F. Gorham, *J. Polym. Sci. Part A* **1966**, 1, 3027
21. Y. X. Kato, I. Saito, H. Takano, K. Mabuchi, T. Hoshino, *Neurosci. Lett.* **2009**, 464, 26
22. J. Miwa, Y. Suzuki, N. Kasagi, *J. Microelectromech. Syst.* **2008**, 17, 611
23. J. C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérésy, S. Lerouge, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2010**, 7, 737.
24. J. Hong, F. Truica-Marasescu, L. Martinu, M. R. Wertheimer, *Plasmas Polym.* **2002**, 7, 245
25. P. Favia, M. V. Stendardo, R. d'Agostino, *Plasmas Polym.* **1996**, 1, 91.
26. M.W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 2002
27. J. Friedrich, G. Kühn, R. Mix, A. Fritz, A. Schönhals, *J. Adhes. Sci. Technol.* **2003**, 17, 1591
28. B. Elkin, C. Oehr, M. Schleicher (unpublished results)

29. M. Haupt, J. Barz, C. Oehr, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 33
30. H.K. Yasuda, *Plasma Polymerization* Academic Press, Orlando FL, 1985
31. K. Bendtzen, *Immunol Lett.* **1988**, 19, 183.
32. A. St-Georges-Robillard, J.C. Ruiz, A. Petit, F. Mwale, W. Wirges, B. Elkin, R. Gerhard, C. Oehr, M.R. Wertheimer, Proc. 14th IEEE Int. Symp. on Electrets (ISE 14), Montpellier, France, 27 to 31 August, **2011**, pp. 53-54.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Ce chapitre présente les résultats complémentaires qui ne sont pas inclus dans l'article présenté au chapitre 3, mais qui relèvent de travaux entièrement sous ma responsabilité. La première partie détaille les résultats des expériences de stabilité aqueuse de l'UV-PE:N, $R = 0,75$ et $R = 1$, déposé sur convoyeur. L'évolution de la composition chimique au cours du temps ainsi que le changement d'épaisseur sont donc présentés. L'adhésion et la croissance des HUVEC sur plusieurs surfaces riches en amines primaires sont étudiées dans la deuxième partie.

4.1 Stabilité des revêtements dans l'eau

Au cours de cette expérience, la stabilité aqueuse des revêtements UV-PE:N, de ratios $R = 0,75$ et $R = 1$, est mesurée. Tout d'abord, la Figure 4-1A présente les résultats concernant l'UV-PE:N $R = 0,75$, soit l'évolution de l'épaisseur du revêtement pendant une semaine d'immersion dans l'eau Milli-Q. L'épaisseur initiale du revêtement déposé sur c-Si est de $26,7 \pm 0,4$ nm et elle diminue à $24,0 \pm 0,9$ nm après 168 h d'immersion. Cette différence d'épaisseur telle que mesurée par ellipsométrie de seulement 10 % après 168 h d'immersion indique que le revêtement est presque insoluble dans l'eau et peut donc y être utilisé de façon prolongée.

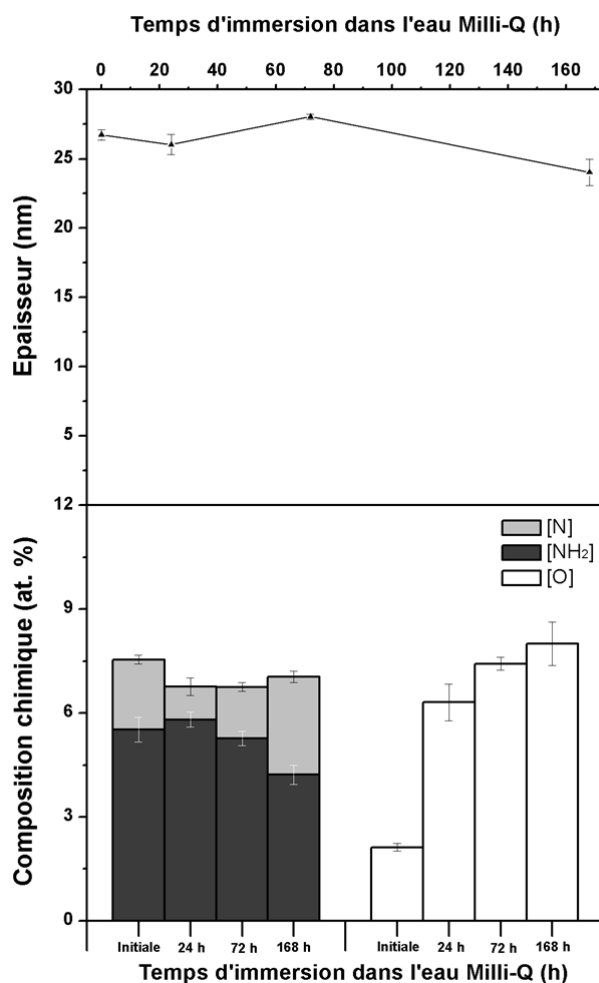
La stabilité chimique est également étudiée et présentée à la Figure 4-1A. [N] et [NH₂] sont présentées en parallèle à [O]. On peut noter que [N] diminue légèrement au cours des premières 24 h et reste stable pendant les 144 h suivantes, tandis que [NH₂] diminue légèrement à partir de 72 h d'immersion. La valeur de [NH₂] demeure toutefois supérieure à [NH₂]_{crit} pendant les premières 72 h (où [NH₂] = $5,3 \pm 0,2$ at.%). Après 168 h d'immersion, [NH₂] est égale à $4,2 \pm 0,3$ at.%, ce qui correspond à [NH₂]_{crit}. Ainsi, l'UV-PE:N peut rester immergé dans l'eau pendant au moins 72 h et possiblement 168 h et toujours contenir suffisamment de groupements R-NH₂ pour permettre l'adhésion des U937. On peut également constater l'augmentation importante de [O] dans les premières 24 h qui semble se stabiliser après 168 h.

La Figure 4-1B présente la stabilité de l'UV-PE:N $R = 1$. On peut constater que l'épaisseur en fonction du temps d'immersion dans l'eau est très stable et ne varie que de 0,4 % entre 0 h et 168 h. L'UV-PE:N $R = 1$ est donc un revêtement insoluble, malgré sa plus haute concentration d'azote. L'expérience indique normalement que plus [N] est élevée, plus la solubilité est

grande [14], alors que pour les deux types d'UV-PE:N présentés ici, le contraire se produit. Cependant, un écart de seulement 1 nm entre la mesure à 0 h et celle à 168 h correspond à 4 % de solubilité; la valeur du pourcentage de solubilité est donc très sensible. L'apparente différence de solubilité des deux ratios pourrait donc être en partie due à la sensibilité de la mesure. Toutefois, le but de cette expérience est de vérifier qu'il n'y a pas de dissolution significative du revêtement, ce qui est confirmé ici. La très faible solubilité dans les deux cas peut être associée à un fort degré de réticulation de l'UV-PE:N.

L'évolution de la composition au cours du temps d'immersion indique que [N] et [NH₂] diminuent au cours des premières 24 h pour atteindre une valeur qui reste stable jusqu'à 168 h d'immersion. Ainsi, malgré une perte de groupement R-NH₂ de $1,4 \pm 0,5$ at.% après 24 h d'immersion, l'UV-PE:N, R = 1, maintient [NH₂] égale à $6,8 \pm 0,4$ at.% après 168 h, ce qui est supérieur à [NH₂]_{crit}. Tout comme R = 0,75, le gain en O s'effectue surtout au cours des premières heures d'immersion pour atteindre des valeurs très similaires à R = 0,75 à 72 h et 168 h. Contrairement au cas du parylène diX AM, où la disparition d'un groupement R-NH₂ s'accompagne de l'ajout d'un atome de O (voir section 3.2.4.1), l'augmentation de [O] ne correspond pas à la diminution de [NH₂]. Ainsi, l'augmentation de [O] n'est pas seulement due à l'oxydation des R-NH₂. Un deuxième mécanisme d'oxydation, probablement lié aux radicaux résiduels, semble donc être présent, tout comme dans le cas des dépôts L-PPE:N. La valeur initiale de [O] est non-nulle et différente pour chacun des ratios alors qu'elle devrait être nulle en raison du fait qu'il n'y a pas d'oxygène dans le réacteur au cours du dépôt. En raison des dispositions physiques du système de dépôt et du système XPS, l'échantillon est inévitablement en contact avec l'oxygène de l'air ambiant lors du transfert de l'échantillon de l'un à l'autre, résultant en [O] non-nulle. La différence entre les deux valeurs initiales est due à un temps de transfert différent. Malgré cette différence, le gain final après 168 h en O semble indépendant de la concentration initiale d'azote du film (ratio des gaz) et atteint une valeur similaire pour les deux ratios. Comme mentionné auparavant, l'augmentation de la valeur de [O] est liée à la réaction de radicaux piégés dans le dépôt avec de l'oxygène de l'air ou dissout dans l'eau.

A



B

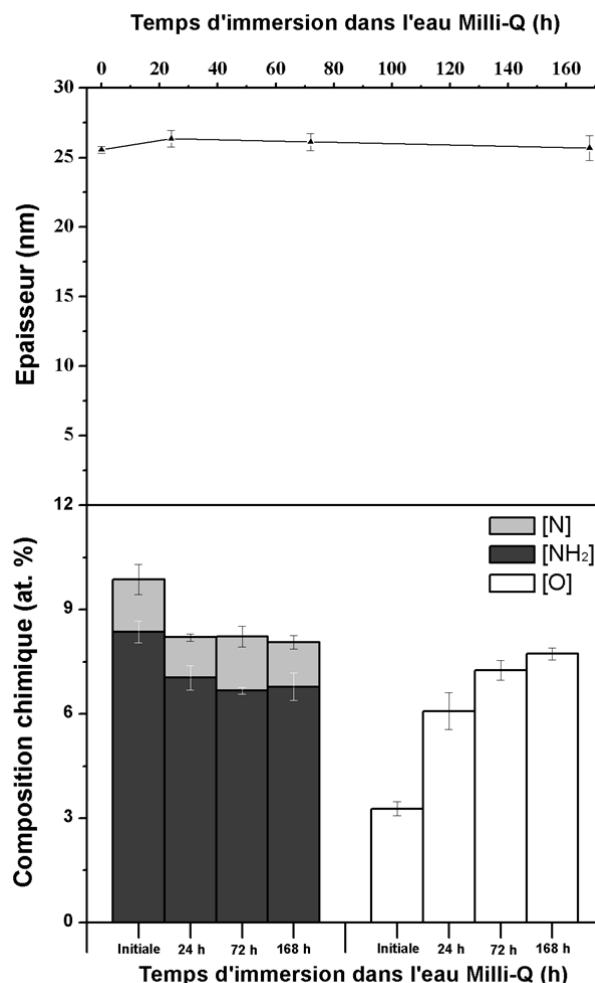


Figure 4-1: Évolution temporelle de l'épaisseur et de la composition ([N], [NH₂] et [O]) de l'UV-PE:N, $R = 0.75$ (A) et $R = 1$ (B) en fonction du temps d'immersion dans l'eau Milli-Q, dans l'obscurité ($n = 2$).

Une étude similaire effectuée par Ruiz *et al.* [14], aussi présentée à l'annexe 1, montre la stabilité de l'UV-PE:N déposé sur un porte-échantillon fixe à 4,5 mm de la lampe UV au lieu du convoyeur (voir section 2.1.2) à 1 cm de la lampe (voir Figure 4-2). Les résultats obtenus lors de cette étude indiquent que plus [N] augmente, plus la solubilité du film augmente : pour $R = 0.75$, la solubilité du revêtement est nulle, pour $R = 1$, la solubilité est d'environ 15 % alors que pour $R = 1.5$, la solubilité est d'environ 95 %. Ainsi, pour $R = 0.75$ et 1, le revêtement peut être considéré insoluble, ce qui correspond aux résultats obtenus avec l'aide du convoyeur. Malgré

une valeur initiale [N] plus faible que pour Ruiz *et al.*, la rétention des groupements R-NH₂ au contact de l'eau à la surface des films présentés à la Figure 4-1 est meilleure, c'est-à-dire que [NH₂] diminue proportionnellement moins pendant les premières 24 h que pour l'étude de Ruiz *et al.* Nous croyons que ceci peut être expliqué par l'utilisation du convoyeur comme porte-échantillon, comme suit : lors du dépôt, l'illumination du substrat par la lampe UV se fait de façon intermittente, permettant ainsi une possible recombinaison supplémentaire lors de l'absence d'illumination des radicaux créés par les rayons UV.

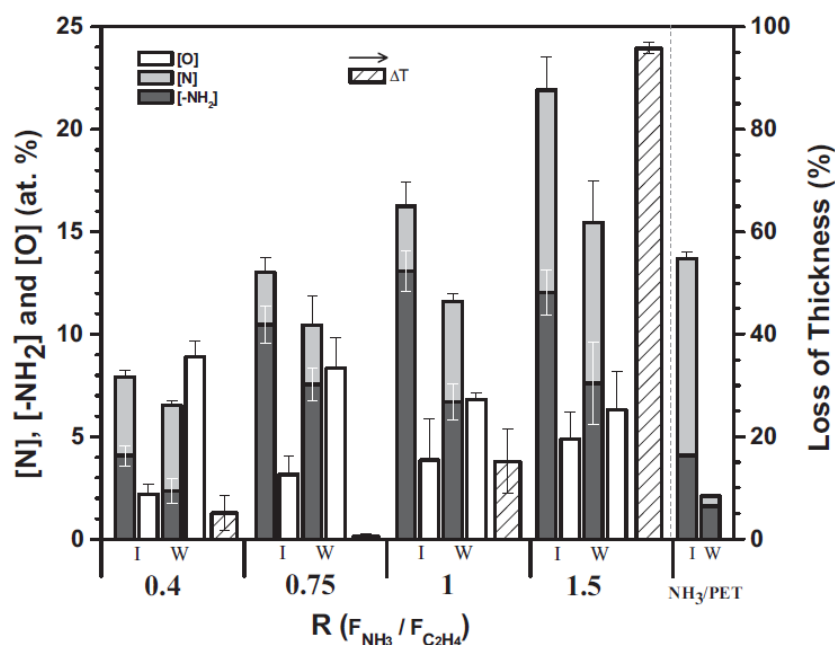


Figure 4-2: Composition ([N], [NH₂] et [O]) de 4 ratios d'UV-PE:N déposés sur porte-échantillon fixe avant (I) et après (W) immersion pendant 20 h dans l'eau Milli-Q. La perte d'épaisseur (*loss of thickness*) durant cette période est également présentée. À la droite du graphique est présentée la composition d'un échantillon de PET traité par plasma NH₃ pendant 15 min avant (I) et après (W) 2 h d'immersion dans l'eau Milli-Q [14], reproduite avec permission.

L'étude de Ruiz *et al.* [14] présente également les résultats concernant la stabilité du L-PPE:N (revêtement utilisé comme référence durant ce projet (voir sections 2.1.1 et 2.1.2). Le revêtement L-PPE:N R = 0,75 présente une solubilité pendant 168 h d'immersion d'environ 9 % (eau Milli-Q) ou 17 % (tampon phosphate salin, PBS, *phosphate buffered saline*) et [NH₂] variant d'environ 7,5 at.% à 3,5 at.% (eau Milli-Q) ou 5 at.% (PBS) pendant les premières 24 h d'immersion. Ensuite, plus R augmente (donc plus [N] et [NH₂] initiales augmentent), plus la solubilité et la perte de groupements R-NH₂ augmentent. Pour cette raison, R = 0,75 est considéré

comme le revêtement L-PPE:N le mieux adapté à la culture cellulaire en milieu aqueux et est utilisé comme surface de culture de référence. Lorsque l'on compare la performance de l'UV-PE:N déposé sur convoyeur avec ce revêtement, on peut constater que la conservation de $[\text{NH}_2]$ au cours du temps d'immersion est supérieure pour l'UV-PE:N. Cette constatation, combinée au fait que la solubilité de l'UV-PE:N ($R = 0,75$ ou $R = 1$) est presque nulle, nous indique que ce revêtement semble être idéal pour la culture cellulaire sur une surface riche en amines primaires.

L'étude extensive de la solubilité du parylène n'a pas été effectuée au cours de ce projet puisque la mesure de l'épaisseur par ellipsométrie ou profilomètre (Dektak) n'est pas possible en raison du substrat de BOPP utilisé. Toutefois, puisque le parylène diX AM possède une couche intermédiaire de parylène C chloré, une mesure XPS avant et après immersion dans l'eau Milli-Q pendant 24 h a été effectuée. Si la présence de chlore est détectée après l'immersion, il est raisonnable de croire que cela est dû à une solubilité de la couche de 100 nm de parylène diX AM résultant en une couche de moins de 10 nm, la profondeur de mesure du XPS. Les résultats sont présentés au Tableau 4.1. Les valeurs de $[\text{Cl}]$ avant et après immersion sont faibles et identiques, indiquant qu'au moins 10 nm de la couche de parylène diX AM est toujours présente.

Tableau 4.1: Concentration de chlore avant et après 24 h d'immersion dans l'eau Milli-Q.

	$[\text{Cl}]$ at. %
Avant immersion	$0,41 \pm 0,03$
Après immersion	$0,38 \pm 0,02$

4.2 Adhésion et croissance de cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)

L'adhésion et la croissance des HUVEC sur différentes surfaces de culture sont évaluées au cours de cette expérience afin de déterminer si l'UV-PE:N ($R = 0,75$ ou $R = 1$) permet une meilleure croissance de ces cellules comparativement à d'autres surfaces, tel que le L-PPE:N. Ainsi, 5 types de surfaces sont étudiés : PS de plaques de culture recouvert de gélatine porcine (PS gélatiné) comme contrôle positif, le PET comme contrôle négatif, le L-PPE:N déposé sur

PET ($R = 0,75$) comme point de comparaison avec Gigout *et al.* [12] ainsi que 2 types d'UV-PE:N déposés sur PET ($R = 0,75$ et $R = 1$).

Les densités cellulaires obtenues après différents temps de culture sont présentées sous le format moyenne \pm écart-type à la Figure 4-3. Un test ANOVA à deux facteurs est utilisé pour analyser l'influence de la surface de culture sur la croissance de cellules. Une valeur de $p < 0,05$ est considéré significative. On peut calculer qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes surfaces de culture ($p > 0,05$), sauf pour le PET où $p < 0,05$ lorsqu'il est comparé aux autres surfaces. Le PET est donc une surface de culture moins adaptée aux HUVEC. Les 2 types de UV-PE:N déposés sur convoyeur sont toutefois des surfaces de culture adaptées aux HUVEC puisque la croissance de ces cellules est similaire à celles sur PS gélatiné et sur L-PPE:N. Il est probable qu'une plus haute concentration de groupements $R-NH_2$ (fournie par l'UV-PE:N) ne soit pas nécessaire à la croissance des HUVEC.

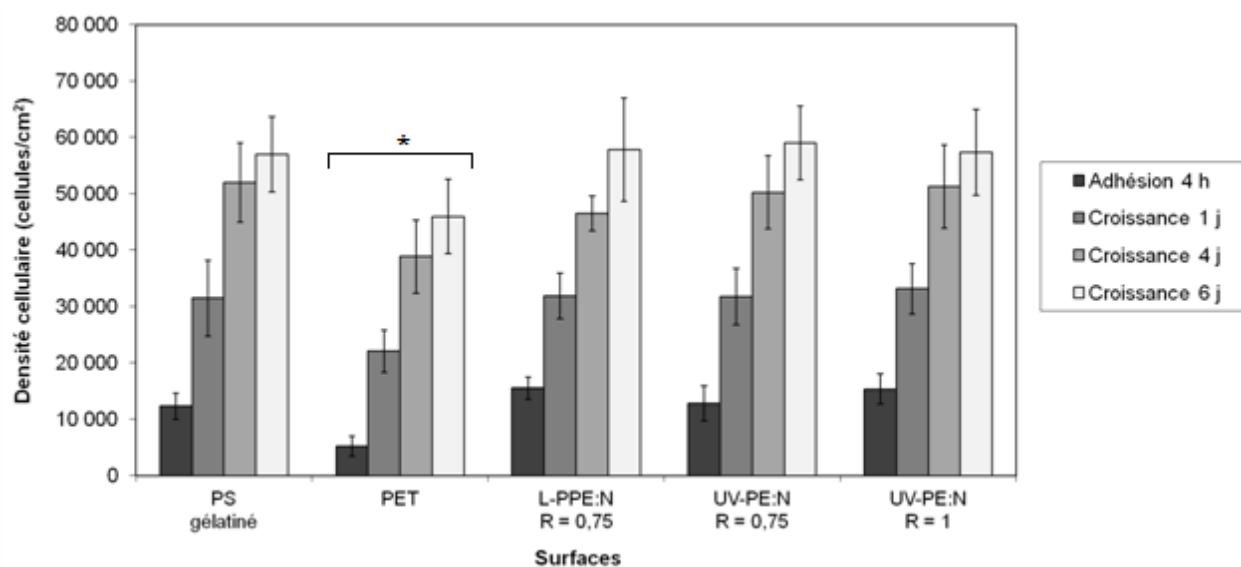


Figure 4-3: Adhésion pendant 4 h et croissance pendant 1, 4 ou 6 j des HUVEC sur PS gélatiné; PET; L-PPE:N $R = 0,75$; et UV-PE:N $R = 0,75$ et $R = 1$. Les résultats sur PET sont statistiquement inférieurs (* $p < 0,05$) aux résultats obtenus sur les autres surfaces en comparant les temps correspondants.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de ce projet était d'étudier le UV-PE:N et son potentiel d'utilisation comme biomatériau dans les domaines des médecines orthopédique et vasculaire et de le comparer à la performance d'autres matériaux similaires riches en amines primaires (parylène diX AM et L-PPE:N). Pour ce faire, plusieurs objectifs spécifiques ont été choisis. Tout d'abord, l'UV-PE:N et le parylène diX AM ont été caractérisés physico-chimiquement afin de connaître précisément leur composition chimique en fonction du temps au contact de l'air et de l'eau ainsi que leur solubilité dans l'eau. Cette caractérisation est nécessaire à l'utilisation de ces revêtements dans le cadre de culture cellulaire ou d'implants. Les autres matériaux susmentionnés ont déjà fait l'objet de telles études [14, 83]. Ensuite, l'adhésion des monocytes U937 a été étudiée sur ces deux revêtements en relation avec $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$, la concentration requise à l'adhésion de cette lignée cellulaire sur plusieurs films polymérisés par plasma ou UV [9]. L'expression de deux gènes, $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$, a été mesurée en fonction du temps d'adhésion des U937. L'expérience n'a pas pu être effectuée avec le parylène diX AM en raison d'un trop faible nombre de cellules adhérant sur ce revêtement à long terme. Finalement, l'adhésion et la croissance des HUVEC sur l'UV-PE:N ont été analysées afin de déterminer le potentiel de l'UV-PE:N comme revêtement de surface améliorant le succès de l'implantation d'une prothèse vasculaire. Dans ce chapitre, les résultats de ses expériences seront résumés brièvement et comparés à ceux de la littérature. Les limitations, ainsi que les perspectives de l'UV-PE:N et du projet seront finalement présentées.

5.1 Synthèse des principaux résultats

5.1.1 Caractérisation physico-chimique

Premièrement, l'analyse du parylène diX AM au contact de l'air nous permet d'affirmer que la technique de dérivation avec le TFBA donne des résultats valides, puisque la valeur mesurée de $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ ($6,5 \pm 0,6 \%$) est très proche de la valeur théorique calculée à partir de la structure chimique du dimère (voir Figure 2-3A), soit $5,9 \%$. De plus, la sélectivité en amines primaires, $[\text{NH}_2]/[\text{N}]$, du parylène mesurée est égale à $98 \pm 5 \%$, correspondant à la valeur « théorique » de 100% . Ceci est important afin de pouvoir se fier aux résultats de dérivation chimique, que certains auteurs remettent en question [84]. L'analyse de la Figure 3-3 et l'absence de radicaux libres (C. Oehr, communication privée) nous permettent également d'affirmer que le parylène est

un matériau pour lequel un seul processus est responsable du vieillissement, soit l'oxydation des amines primaires où l'ajout d'un atome d'oxygène est responsable de la disparition d'un groupement R-NH₂.

L'UV-PE:N présente une sélectivité élevée de 73 ± 4 % pour $R = 0,75$ et de 74 ± 6 % pour $R = 1$. À l'air ambiant, la concentration $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ diminue de 2,5 % seulement pour chacune de ces valeurs de R , à partir de $6,2 \pm 0,4$ % ($R = 0,75$) et $7,2 \pm 0,4$ % ($R = 1$). Ces valeurs initiales sont similaires à celles du parylène diX AM, malgré une sélectivité plus faible. Elles sont également plus élevées que le revêtement d'allylamine polymérisée par plasma pulsé de Yang *et al.* [85] contenant $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ initiale la plus élevée, soit $3,1 \pm 0,3$ %. La décroissance de $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ à la surface de l'UV-PE:N se stabilise à une valeur finale dépendante de la valeur initiale de $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$. Il est ainsi possible d'obtenir un revêtement riche en amines primaires même après un long temps d'entreposage au contact de l'air ambiant. Son vieillissement plus complexe suggère au moins deux processus : l'oxydation et l'hydrolyse des R-NH₂ au contact de l'air ambiant et l'oxydation des radicaux libres qui seraient présents dans la couche mince.

Cette présence de plusieurs processus de vieillissement est similaire à ce qui se trouve dans la littérature. En effet, Gegenbach *et al.* [86], présentent des résultats concernant le vieillissement, mesurés par XPS seulement, de couches minces d'allylamine (PP-AA) et d'heptylamine (PP-HA) polymérisées par plasma. Les résultats indiquent que $[\text{N}]/[\text{C}]$ demeure presque constante à 15,3 % pendant 68 j de vieillissement pour PP-AA et diminue légèrement de 8,5 à 7,1 % pour PP-HA. La valeur de $[\text{O}]/[\text{C}]$, quant à elle, augmente rapidement au cours des premiers jours (de 4,9 % à 7,3 % en 2 j pour PP-AA et de 2 % à 13 % en 7 j pour PP-HA), puis plus lentement jusqu'à atteindre un plateau (jusqu'à 25 % après 1 an pour PP-AA et 11,1 % après 68 j pour PP-HA). Les auteurs attribuent ce vieillissement à deux phénomènes : l'oxydation des R-NH₂, responsable de l'augmentation rapide de O et la réorganisation hydrophobe, restructuration de la surface du revêtement où les groupements polaires s'enfouissent dans le revêtement, responsable du vieillissement après une cinquantaine de jours. Comme l'analyse du vieillissement de l'UV-PE:N et du parylène a été arrêtée à 26 j, l'apparent début de stabilité de $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ et $[\text{O}]/[\text{C}]$ est possiblement en réalité le début du vieillissement dû à la réorganisation hydrophobe de la surface des revêtements.

Les résultats des expériences de stabilité de l'UV-PE:N dans l'eau Milli-Q indiquent que ce revêtement, pour les valeurs de R étudiées, est insoluble lorsque déposé à l'aide du convoyeur comme porte-échantillon, et ce, malgré une concentration élevée de N. De plus, après 7 j d'immersion, la valeur de $[\text{NH}_2]$ pour $R = 0,75$ et $R = 1$ diminue de seulement $1,3 \pm 0,5 \%$ et $1,6 \pm 0,5 \%$, respectivement. Ainsi, il est possible de laisser le revêtement en contact avec de l'eau pendant au moins une semaine tout en conservant une concentration de groupements R-NH_2 élevée. Le gain en O se produit surtout au cours des premières heures d'immersion et n'est pas seulement relié à la diminution de $[\text{NH}_2]$. Il se stabilise autour d'une valeur similaire pour les deux ratios R . L'UV-PE:N est donc un revêtement suffisamment stable sur 7 jours pour une utilisation potentielle *in vivo* à long terme. Ainsi, il est raisonnable de penser que cette stabilité d'au moins 7 jours permettrait aux cellules d'interagir avec le revêtement suffisamment longtemps pour fabriquer une matrice extracellulaire responsable de l'adhésion à long terme de ces cellules même [87].

Plusieurs études de la stabilité aqueuse de revêtements polymérisés par plasma sont disponibles dans la littérature et tentent de comprendre les phénomènes impliqués. Par exemple, Finke *et al.* [88] ont étudié la stabilité d'une couche mince d'allylamine polymérisée par plasma micro-ondes (2,45 GHz) avec de l'ammoniac comme gaz porteur. La mise en contact du revêtement avec le milieu aqueux se fait sous la forme d'un rinçage à l'eau dans un agitateur orbital pendant 0,25 h à 11,5 h. Au début, $[\text{NH}_2]/[\text{C}]$ passe de 2,5 % à 0,5 % en 0,25 h puis demeure stable jusqu'à 11,5 h. $[\text{O}]/[\text{C}]$ diminue de 4 % en 0,5 h, puis augmente jusqu'à 16 %. Les auteurs attribuent ces pertes à l'enlèvement de fragments oligomères peu liés au revêtement par l'eau. L'UV-PE:N pourrait subir un phénomène similaire, mais comme $[\text{NH}_2]$ ne diminue pas beaucoup au cours des premières 24 h, ces fragments ne constitueraient pas significativement le film. Artemenko *et al.* [38] ont produit des revêtements riches en amines primaires par pulvérisation magnétron de nylon 6,6 dans un gaz d'Ar, d'Ar/N₂ ou de N₂/H₂. Les différents revêtements ont été immergés dans l'eau déionisée pendant 24 h. Les films déposés dans Ar ou Ar/N₂ se sont avérés solubles à moins de 9 %, ce qui est considéré insoluble par les auteurs. Le troisième type de film, déposé dans N₂/H₂, contenait la plus grande concentration de N et il était soluble à 35 %, ce qui est beaucoup plus soluble que l'UV-PE:N.

Il était précisé dans la revue de littérature, section 1.1.2, que la photo-polymérisation ultraviolette permet d'obtenir des réactions plus spécifiques et sélectives que la polymérisation

plasma. Cette affirmation a été confirmée pendant ce projet, puisque la sélectivité $[\text{NH}_2]/[\text{N}]$ du L-PPE:N, valant moins de 50 %, est inférieure à celle de l'UV-PE:N, valant 75 %. Aussi, il semble que l'utilisation du convoyeur permet d'accroître la stabilité, tant chimique ($[\text{NH}_2]$) que physique (solubilité) de l'UV-PE:N. Cela est probablement dû au fait que, l'illumination n'étant pas continue, une réticulation supplémentaire du revêtement peut être atteinte par la recombinaison de radicaux pendant la rotation du convoyeur, comparativement à une illumination continue résultant en un dépôt plus court.

5.1.2 Adhésion des monocytes U937

Des travaux antérieurs avaient montré que l'adhésion des monocytes humains U937 sur plusieurs types de revêtements polymérisés par plasma ou ultraviolets requiert que $[\text{NH}_2]$ soit supérieure à $[\text{NH}_2]_{\text{crit}} = 4,2 \pm 0,5 \text{ at.}\%$ [9]. Les résultats des expériences effectuées au cours de cette maîtrise indiquent que l'adhésion des U937 sur l'UV-PE:N $R = 0,75$, à différents temps de vieillissement, respecte ce seuil critique. Le parylène diX AM, quant à lui, affiche un comportement fort différent : l'adhésion des U937 se fait *proportionnellement*, sans limite critique claire, à $[\text{NH}_2]$. La croissance des cellules ne se prolonge toutefois pas après 24 h. Ce résultat concernant l'adhésion proportionnelle est en contradiction avec les résultats obtenus par Girard-Lauriault *et al.* [9]. Il existe cependant une différence méthodologique entre les deux expériences. Pour obtenir différentes concentrations de R- NH_2 sur les surfaces, Girard-Lauriault *et al.* ont fait varier les ratios de gaz et les cultures ont été effectuées sans permettre le vieillissement au contact de l'air. Pour le présent projet, il était impossible de faire la même chose pour varier la concentration de R- NH_2 sur la surface du parylène diX AM, étant donné que $[\text{NH}_2]$ de ce dernier est dictée par le monomère utilisé. Ainsi, que ce soit pour l'UV-PE:N ou pour le parylène, l'obtention de $[\text{NH}_2]$ inférieure à 4,2 at.% se fait en laissant le revêtement vieillir au contact de l'air ambiant, soit 19 j pour l'UV-PE:N et 6 j pour le parylène. Toutefois, la présence de $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ est observée pour l'UV-PE:N, malgré l'utilisation du vieillissement pour varier $[\text{NH}_2]$. Il est donc difficile d'expliquer la différence de comportement du parylène. Une des différences majeures entre les deux revêtements est le fait que le parylène diX AM ne contient que des R- NH_2 comme groupements azotés à sa surface ($[\text{NH}_2]/[\text{N}] = 100 \%$) alors que l'UV-PE:N contient d'autres types de groupements azotés ($[\text{NH}_2]/[\text{N}] \sim 75 \%$), dont des imides, nitriles, etc. Après 6 j de vieillissement, le parylène ne contient plus seulement des R- NH_2 . Une hypothèse est

donc que le vieillissement du parylène (et non celui de l'UV-PE:N) introduit un ou plusieurs autres types de groupements fonctionnels permettant l'adhésion des U937. Une autre hypothèse est la possible interaction électrostatique entre les groupements $R-NH_2$ se modifiant en groupements NH_3^+ en contact avec l'eau et les protéines d'adhésion présentes dans le milieu de culture et nécessaire à l'adhésion des U937 [15]. En mesurant le potentiel électrique produit par un revêtement de parylène vieilli humide à l'aide d'un voltmètre électrostatique, on peut constater (voir Figure 3-8) que plus $[NH_2]$ est élevée, plus le potentiel électrique produit est élevé et demeure au-dessus de 45 V après 10 j de vieillissement. Pour le L-PPE:N, par contre, il demeure sous 40 V même pour un échantillon fraîchement déposé (non vieilli). Cette idée a fait l'objet d'une conférence et d'un article invité publié le 20 novembre 2012 dans le *Japanese Journal of Applied Physics* [15]. Il est toutefois difficile de séparer les effets électrostatiques des effets de la composition chimique. La différence de comportement entre le parylène diX AM et l'UV-PE:N demeure inexpliquée.

L'expression de deux cytokines, $TNF-\alpha$ et $IL-1\beta$, lors de l'adhésion des U937 sur l'UV-PE:N a également été étudiée. Ces deux cytokines sont sécrétées pendant une réponse inflammatoire par les monocytes et les macrophages [89]. Ainsi, l'analyse de l'expression de ces deux gènes lors de l'adhésion des U937 sur l'UV-PE:N permet de déterminer si le revêtement induit une réponse inflammatoire des U937. Les études précédentes indiquent que l'adhésion sur L-PPE:N et H-PPE:N provoque une expression transitoire de ces gènes pendant 3 h, revenant à la valeur de contrôle après 12 h. Les résultats de qRT-PCR sur l'adhésion des U937 sur UV-PE:N indiquent au contraire qu'aucune réaction inflammatoire n'est induite puisqu'aucune expression génétique supérieure au contrôle (suspension cellulaire d'U937) n'est observée à 3 h et 24 h d'adhésion. Une expression supérieure au contrôle, transitoire seulement, peut cependant s'être produite entre 3 h et 24 h d'adhésion. Toutefois, l'expression des deux gènes à 24 h étant comparable à celle du contrôle et donc revenue à la normale, on peut affirmer qu'aucune réaction inflammatoire majeure n'est induite par l'UV-PE:N lors de l'adhésion des monocytes U937. Ainsi, l'étude de l'influence des particules d'usure des prothèses de hanche, comme le Co^{2+} et le Cr^{3+} , sur les U937 ne serait donc pas perturbée par une inflammation due au revêtement. L'observation d'une réaction inflammatoire serait seulement attribuable aux particules d'usure, et non à l'UV-PE:N.

5.1.3 Adhésion et croissance des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC)

Le but de cette expérience était d'évaluer si l'UV-PE:N peut être un revêtement intéressant pour favoriser l'adhésion et la croissance d'une couche de cellules endothéliales pour les prothèses vasculaires. Les HUVEC sont utilisées comme modèle *in vitro* pour observer l'adhésion après 4 h et la croissance sur 6 j. L'analyse statistique sur les résultats indique que le PET donne des résultats inférieurs à ceux des autres surfaces. Ces dernières donnent des résultats non statistiquement différents ($p > 0,05$) lorsque comparées entre elles. Ainsi, l'ajout d'un revêtement riche en R-NH₂ sur le PET améliore l'adhésion et la croissance des HUVEC. Cependant, elles prolifèrent de la même façon, peu importe [NH₂] à la surface. Le Tableau 5.1 présente les résultats de la présente étude comparés à ceux de Gigout *et al.* [12] (obtenu avec les mêmes conditions expérimentales) en calculant le pourcentage d'adhésion après 4 h d'incubation d'après l'équation 5.1. L'aire d'adhésion est déterminée par l'aire intérieure des cylindres de clonage en verre, soit 0,5024 cm².

$$\% \text{ d'adhésion} = \frac{\text{densité cellulaire} \left(\frac{\text{cell}}{\text{cm}^2} \right) \times \text{aire d'adhésion (cm}^2\text{)}}{\text{nombre de cellules inoculées par puits (cell)}} \times 100 \quad (5.1) \quad [12]$$

Tableau 5.1: Comparaison du pourcentage d'adhésion des HUVEC après 4 h d'incubation.

	Présents résultats (section 4.2) % d'adhésion	Gigout <i>et al.</i> [12] % d'adhésion
PS gélatiné	41 ± 8	~ 100
PET	17 ± 6	~ 60
L-PPE:N R = 0,75	52 ± 8	~ 88
UV-PE:N R = 0,75	43 ± 11	-
UV-PE:N R = 1	51 ± 9	-

En observant ce tableau, on peut constater que pour Gigout *et al.*, le PS gélatiné présente le meilleur % d'adhésion, suivi par le L-PPE:N alors que le contraire se produit pour les présents résultats. Toutefois, sachant que la différence entre le PS gélatiné et le L-PPE:N n'est pas significative, la tendance des résultats est similaire pour les 2 études dans le sens où l'adhésion

sur le PET est inférieure à celle sur les deux autres revêtements. Cependant, la valeur du % d'adhésion est environ 2 fois plus faible que pour les résultats de Gigout *et al.* Il est utile de noter que Gigout *et al.* ont observé une plus forte résistance des HUVEC sur L-PPE:N que sur PET lorsque les cellules sont soumises à une contrainte de cisaillement occasionnée par un écoulement sanguin simulé. Il serait ainsi intéressant de comparer les revêtements d'UV-PE:N dans le cadre de tests de résistance au cisaillement représentant un peu plus la force d'attachement et le contexte d'utilisation *in vivo*.

Dans la littérature, plusieurs tentatives d'améliorer la prolifération des HUVEC sur le PET ou le PTFE, matériaux utilisés pour faire les prothèses vasculaires, ont été effectuées. Ramires *et al.* [45] ont utilisé différents traitements au plasma d'ammoniac ou d'oxygène pour traiter le PET et observé la croissance des HUVEC. Leur seul résultat statistiquement supérieur à la culture sur PS gélatiné (contrôle positif) est la croissance pendant 9 j sur le PET traité au plasma NH_3/H_2 . Ils n'ont pas testé le PET nu. Pu *et al.* [46] ont également utilisé le traitement par plasma pour modifier le PET et le PTFE. La prolifération des HUVEC pendant 1 j sur une surface de PET traitée par plasma NH_3 présentait une augmentation de 1,3 fois celle sur PET non traité. Cette augmentation est supérieure à celles observées avec l'UV-PE:N, $R = 0,75$ où elle présente une augmentation de 0,4 fois la valeur sur PET non traité, et $R = 1$ où elle augmente de 0,5 fois. Toutefois, il est clair que l'ajout de groupement R-NH_2 sur le PET favorise la prolifération des HUVEC.

5.2 Limitations et perspectives de l'UV-PE:N pour des applications biomédicales

L'UV-PE:N comporte plusieurs limitations et perspectives intéressantes à discuter ici. Tout d'abord, une des limites les plus importantes de l'UV-PE:N est la taille des échantillons qu'il est possible de déposer. En raison de la lampe utilisée, des échantillons de 1 cm^2 (avec le porte-échantillon fixe) ou un ruban de 1 par 24 cm^2 (avec le convoyeur) peuvent être produits. L'utilisation du convoyeur constitue une première amélioration essentielle à l'étude de l'UV-PE:N et permet la culture cellulaire, avec le désavantage que le taux de dépôt diminue (demandant ainsi des temps de dépôt de plusieurs heures). Toutefois, pour une application à grande échelle de ce revêtement, une lampe VUV de diamètre plus grand sera nécessaire. Une telle lampe permettrait

d'augmenter la surface de dépôt tout en conservant un temps de dépôt plus court. Il serait donc possible de déposer une couche mince avec une épaisseur de plus de 30 nm en moins de 4,5 h ou 7 h, dépendamment du ratio R utilisé. Toutefois, la stabilité aqueuse du revêtement, spécialement la rétention des groupements $R-NH_2$ au contact de l'eau, est meilleure avec l'utilisation du convoyeur qu'avec l'utilisation du porte-échantillon fixe (voir section 4.1). La combinaison du convoyeur avec une grande lampe VUV permettrait de combiner deux avantages. En effet, il serait possible d'augmenter grandement la taille des dépôts, sans toutefois diminuer le long temps de dépôt. La stabilité aqueuse serait alors conservée. Une lampe de cette taille est toutefois difficile à obtenir en raison du coût de fabrication de larges fenêtres de MgF_2 , permettant l'obtention d'un vide dans la lampe tout en transmettant les rayons UV. Elsner *et al.* [90] ont cependant développé une source excimère à l'argon sans fenêtre qui produit un faisceau d'ultraviolets avec un pic d'intensité à 126 nm. Un dépôt de couches minces à pression atmosphérique serait ainsi possible grâce à cette source.

Finalement, une des perspectives à envisager pour l'UV-PE:N est le greffage de biomolécules sur sa surface afin de créer un revêtement bioactif. Ainsi, des molécules pourraient être greffées sur le revêtement pour favoriser l'endothélialisation de prothèses vasculaires, telles que l'héparine, le collagène de type I, la fibronectine ou une séquence de protéines [10, 12]. Il serait également possible d'utiliser l'UV-PE:N pour d'autres applications. Par exemple, le greffage de la chondroïtine-4-sulfate (CS) ainsi que du facteur de croissance de l'épiderme (EGF) sur un revêtement de L-PPE:N permet de créer un revêtement bioactif anti-apoptotique pour le traitement de l'anévrisme de l'aorte abdominale [43]. Le greffage étant réalisé via les groupements $R-NH_2$, l'UV-PE:N serait possiblement un candidat idéal à ce type de greffage.

5.3 Limitations et perspectives du projet

Le projet lui-même présente également des limitations et perspectives. La stabilité aqueuse de l'UV-PE:N est étudiée après 24 h, 72 h et 168 h d'immersion, mais ceci ne permet pas d'évaluer la cinétique de la perte d'épaisseur, surtout pendant les premières heures. Puisque seule l'épaisseur sèche est mesurée, il serait intéressant de mesurer la solubilité en temps réel et de voir si le revêtement gonfle au contact de l'eau. Un instrument qui permet de le faire est la micro-balance à cristal de quartz avec module de dissipation (QCM-D). Ce système, disponible au Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV) du CRCHUM, permet de mesurer plusieurs

propriétés mécaniques de couches minces, dont l'épaisseur au cours du temps, en mesurant la fréquence de résonance et la dissipation du cristal sur lequel est déposée la couche mince [91].

Seuls les ratios $R = 0,75$ et $R = 1$ sont étudiés au cours du projet, en raison de leur potentiel décelé par Ruiz *et al.* [14]. Comme il s'est avéré que le $R = 1$ est également insoluble malgré son $[NH_2]$ plus élevé, il serait intéressant de caractériser des valeurs de R plus élevées. L'effet du pH sur la stabilité aqueuse de l'UV-PE:N n'est également pas étudié. Le pH du PBS (7,4) étant différent de celui de l'eau Milli-Q (légèrement acide dû à l'absorption de CO_2 atmosphérique), il peut influencer celle-ci.

L'utilisation des revêtements riches en R- NH_2 dans le domaine biomédical nécessite que ceux-ci soient stériles. Au cours de ce projet, les revêtements ont été utilisés de façon non-stérile ou stérilisés avec de l'éthanol 70 %. Les techniques de stérilisation couramment utilisées en hôpitaux devraient être testées, telles que l'autoclave, l'oxyde d'éthylène, le Sterrad[®], irradiation UV et le glutaraldéhyde, afin de vérifier la préservation de la composition chimique, ainsi que de l'intégrité de la structure physique du revêtement. De plus, de nombreux autres défis seraient à relever pour une application de ces revêtements sur des implants tels que des prothèses vasculaires. Par exemple, il demeure nécessaire de trouver une technique pour déposer le revêtement d'UV-PE:N sur la paroi interne d'une prothèse vasculaire. L'insertion des gaz n'est pas un problème. Le défi sera de trouver une façon d'illuminer cette paroi avec une lampe VUV et d'une intensité suffisante. Aussi, il sera nécessaire de caractériser les dépôts d'UV-PE:N sur un substrat représentant mieux les biomatériaux utilisés en ce moment pour fabriquer les prothèses, soit le PET tissé (DACRON) ou le ePTFE, et non le PET lisse utilisé lors de ce projet.

Afin de comprendre la différence entre l'adhésion des monocytes U937 sur l'UV-PE:N et le parylène diX AM, il serait intéressant de caractériser extensivement leur chimie de surface après vieillissement lorsque $[NH_2]$ est sous 4,2 at.%. Des mesures par XPS haute résolution peuvent être prises, combinées avec la spectroscopie infrarouge pour identifier toutes les liaisons présentes. Il serait alors en principe possible de déterminer si un ou plusieurs groupements sont présents à la surface du parylène et non de l'UV-PE:N, groupements qui permettent aux U937 d'adhérer sur le premier.

Finalement, l'étude de Gigout *et al.* [12] a montré que le L-PPE:N est un revêtement augmentant significativement la résistance des HUVEC au cisaillement causé par un écoulement

laminaire, représentant un peu plus les conditions *in vivo* des prothèses vasculaires, lorsqu'il est comparé au PET non traité. Les résultats présentés à section 4.2 ont montré que l'adhésion et la croissance des HUVEC sur UV-PE:N sont statistiquement similaires à celle sur L-PPE:N et PS gélatiné. Il serait donc pertinent d'étudier la résistance au cisaillement causé par un écoulement laminaire des HUVEC adhérentes sur UV-PE:N afin de déterminer si ce revêtement permet d'augmenter cette résistance. Ainsi, peut-être que malgré une adhésion et croissance similaire, l'UV-PE:N se distinguera des autres revêtements par son aptitude à favoriser la résistance au cisaillement.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'évaluer le potentiel d'utilisation de l'UV-PE:N, une couche mince riche en amines primaires déposée par photo-polymérisation ultraviolette, dans les domaines de médecines orthopédique et vasculaire, tout en le comparant au parylène diX AM. Pour ce faire, la caractérisation physico-chimique de ces deux revêtements a d'abord été effectuée afin de connaître le comportement de ces revêtements lorsqu'ils sont en contact avec l'air ambiant ou un milieu aqueux. Il a ainsi été possible de déterminer que le vieillissement subi par le parylène diX AM en contact avec l'air est rapide et causé par l'oxydation des groupements $R-NH_2$ où la disparition de chaque groupement $R-NH_2$ s'accompagne de l'ajout d'un atome d'oxygène. Le vieillissement des deux types d'UV-PE:N est plus lent et permet de conserver $[NH_2]/[C]$ supérieure à 3,8 % après 26 jours dans l'air. Au moins deux processus sont responsables du vieillissement de l'UV-PE:N dans l'air et dans l'eau, l'oxydation des groupements $R-NH_2$ et la réaction des radicaux présents dans le revêtement avec l'oxygène de l'air ou dissout dans l'eau. La rétention des $R-NH_2$ lorsque l'UV-PE:N est immergé dans l'eau est supérieure lorsque l'UV-PE:N est déposé à l'aide du convoyeur versus sans le convoyeur. L'UV-PE:N R = 1 est insoluble et conserve plus de 80 % de sa concentration $[NH_2]$ initiale après une semaine d'immersion dans l'eau.

Les travaux effectués au cours de cette maîtrise ont permis d'établir que l'UV-PE:N est une surface de culture permettant l'adhésion des monocytes U937 et donc l'étude de l'effet des particules d'usure des prothèses de hanche sur ces monocytes, en raison de l'absence de réaction inflammatoire lors de leur adhésion. Ensuite, l'existence d'une concentration $[NH_2]_{crit}$ requise pour l'adhésion des monocytes U937 sur plusieurs types de revêtements polymérisés par plasma ou ultraviolets a été confirmée pour l'UV-PE:N déposé à l'aide du convoyeur. Par contre, le parylène diX AM affiche un comportement différent : l'adhésion des monocytes U937 se fait « proportionnellement » à $[NH_2]$. L'UV-PE:N permet la survie des monocytes pendant 24 h, tandis que ces cellules se détachent ou meurent sur le parylène diX AM pendant ce temps. Il existe donc une différence entre les deux types de revêtement permettant cette adhésion qui reste inconnue et qui mériterait davantage de travaux.

Finalement, l'adhésion et la croissance des HUVEC ont été observées sur les deux types d'UV-PE:N étudiés, ainsi que sur le L-PPE:N et le PS gélifié couramment utilisé en culture

cellulaire. Elles se sont révélées statistiquement supérieures aux résultats obtenus sur PET. L'expérience permet de conclure que l'UV-PE:N est une surface de culture adaptée aux HUVEC, performant de façon similaire au PS gélatiné qui est une surface reconnue pour promouvoir la prolifération des HUVEC. L'UV-PE:N est donc un revêtement de surface prometteur dans le domaine biomédical. Cependant, plusieurs autres défis et essais cellulaires seront requis avant de pouvoir utiliser ce revêtement sur la paroi interne des prothèses vasculaires.

RÉFÉRENCES

- [1] F. D. Ingraham, E. Alexander et D. D. Matson, "Polyethylene, a new synthetic plastic for use in surgery; experimental applications in neurosurgery," *Journal of the American Medical Association*, vol. 135, no. 2, pp. 82-7, 1947.
- [2] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, *Biomaterials Science*, 2^e éd., San Diego: Elsevier Academic Press, 851 pages, 2004.
- [3] B. D. Ratner, "Surface Modification of Polymeric Biomaterials," *Symposium on Surface Modification of Polymeric Biomaterials*, pp. 1-10, Anaheim, Californie, USA, 1997.
- [4] H. J. Griesser, R. C. Chatelier, T. R. Gengenbach, G. Johnson et J. G. Steele, "Growth of human cells on plasma polymers: Putative role of amine and amide groups," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 5, pp. 531-554, 1994.
- [5] F. Mwale, S. Rampersad, J.-C. Ruiz, P.-L. Girard-Lauriault, A. Petit, J. Antoniou, S. Lerouge et M. R. Wertheimer, "Amine-Rich Cell-Culture Surfaces for Research in Orthopedic Medicine," *Plasma Medecine*, vol. 1, no. 2, pp. 115-133, 2011.
- [6] Institut canadien d'information sur la santé, "Rapport annuel de 2007 du Registre canadien des remplacements articulaires (RCRA) — Arthroplasties de la hanche et du genou au Canada," Ottawa, 2008.
- [7] Y.-K. Gong, F. Mwale, M. R. Wertheimer et F. M. Winnik, "Promotion of U937 cell adhesion on polypropylene surfaces bearing phosphorylcholine functionalities," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 15, no. 11, pp. 1423-1434, 2004.
- [8] L. Luo, A. Petit, J. Antoniou, D. J. Zukor, O. L. Huk, R. C. W. Liu, F. M. Winnik et F. Mwale, "Effect of cobalt and chromium ions on MMP-1, TIMP-1, and TNF- α gene expression in human U937 macrophages: A role for tyrosine kinases," *Biomaterials*, vol. 26, no. 28, pp. 5587-5593, 2005.
- [9] P. L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H. T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale et M. R. Wertheimer, "Adhesion of Human U937 Monocytes to Nitrogen-Rich Organic Thin Films: Novel Insights into the Mechanism of Cellular Adhesion," *Macromolecular Bioscience*, vol. 9, no. 9, pp. 911-921, 2009.

- [10] S. Sarkar, K. M. Sales, G. Hamilton et A. M. Seifalian, "Addressing thrombogenicity in vascular graft construction," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 82B, no. 1, pp. 100-108, 2007.
- [11] A. M. Seifalian, A. Tiwari, G. Hamilton et H. J. Salacinski, "Improving the Clinical Patency of Prosthetic Vascular and Coronary Bypass Grafts: The Role of Seeding and Tissue Engineering," *Artificial Organs*, vol. 26, no. 4, pp. 307-320, 2002.
- [12] A. Gigout, J.-C. Ruiz, M. R. Wertheimer, M. Jolicœur et S. Lerouge, "Nitrogen-Rich Plasma-Polymerized Coatings on PET and PTFE Surfaces Improve Endothelial Cell Attachment and Resistance to Shear Flow," *Macromolecular Bioscience*, vol. 11, no. 8, pp. 1110-1119, 2011.
- [13] A. St-Georges-Robillard, J.-C. Ruiz, A. Petit, H. T. Wang, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, S. Lerouge et M. R. Wertheimer, "Adhesion of U-937 Monocytes on Different Amine-functionalised Polymer Surfaces," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 9, no. 3, pp. 243-252, 2012.
- [14] J. C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérésy, S. Lerouge et M. R. Wertheimer, "Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 9-10, pp. 737-753, 2010.
- [15] M. R. Wertheimer, A. St-Georges-Robillard, S. Lerouge, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, W. Wirges et R. Gerhard, "Amine-Rich Organic Thin Films for Cell Culture: Possible Electrostatic Effects in Cell-Surface Interactions," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 51, no. 11, 2012.
- [16] I. Langmuir, "The Interaction of Electron and Positive Ion Space Charges in Cathode Sheaths," *Physical Review*, vol. 33, no. 6, pp. 954-989, 1929.
- [17] M. A. Lieberman et A. J. Lichtenberg, *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 800 pages, 2005.
- [18] H. Conrads et M. Schmidt, "Plasma generation and plasma sources," *Plasma Sources Science and Technology*, vol. 9, no. 4, pp. 441, 2000.
- [19] H. Biederman, *Plasma Polymer Films*, Londres: Imperial College Press, 391 pages, 2004.

- [20] H. K. Yasuda, *Plasma Polymerization*, Londres: Academic Press, 432 pages, 1984.
- [21] J. M. Tibbitt, M. Shen et A. T. Bell, "Structural Characterization of Plasma-Polymerized Hydrocarbons," *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, vol. 10, no. 8, pp. 1623-1648, 1976.
- [22] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar et H. J. Griesser, "Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 3, no. 6-7, pp. 392-418, 2006.
- [23] M. J. Garcia-Fernandez, L. Martinez-Calvo, J. C. Ruiz, M. R. Wertheimer, A. Concheiro et C. Alvarez-Lorenzo, "Loading and Release of Drugs from Oxygen-rich Plasma Polymer Coatings," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 9, no. 5, pp. 540-549, 2012.
- [24] F. Truica-Marasescu, J. C. Ruiz et M. R. Wertheimer, "Vacuum-ultraviolet (VUV) Photopolymerization of Amine-rich Thin Films from Ammonia-Hydrocarbon Gas Mixtures," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 9, no. 5, pp. 473-484, 2012.
- [25] F. Truica-Marasescu, S. Pham et M. R. Wertheimer, "VUV processing of polymers: Surface modification and deposition of organic thin films," *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 265, no. 1, pp. 31-36, 2007.
- [26] F. Truica-Marasescu et M. R. Wertheimer, "Vacuum-Ultraviolet Photopolymerisation of Amine-Rich Thin Films," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 209, no. 10, pp. 1043-1049, 2008.
- [27] E. M. Liston, L. Martinu et M. R. Wertheimer, "Plasma surface modification of polymers for improved adhesion: a critical review," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 7, no. 10, pp. 1091-1127, 1993.
- [28] S. Guimond et M. R. Wertheimer, "Surface degradation and hydrophobic recovery of polyolefins treated by air corona and nitrogen atmospheric pressure glow discharge," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 94, no. 3, pp. 1291-1303, 2004.
- [29] R. Vedula, S. Kaza et S. B. Desu, "Chemical Vapor Deposition of Polymers: Principles, Materials, and Applications," dans *Chemical Vapor Deposition*, J. H. Park et T. S. Sudarshan, Éd., Materials Park: ASM International, 2001, pp. 243-286.

- [30] W. M. Salzman et T. R. Kyriakides, "Cell Interactions with Polymers," dans *Principles of Tissue Engineering*, R. Lanza, R. Langer et J. P. Vacanti, Éd., Burlington: Elsevier Academic Press, 2007, pp. 279-296.
- [31] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean et Z. Schwartz, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response," *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 137-146, 1996.
- [32] S. L. Schor et J. Court, "Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen," *Journal of cell science*, vol. 38, pp. 267-81, 1979.
- [33] R. Förch, A. N. Chifen, A. Bousquet, H. L. Khor, M. Jungblut, L. Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E. K. Sinner et W. Knoll, "Recent and Expected Roles of Plasma-Polymerized Films for Biomedical Applications," *Chemical Vapor Deposition*, vol. 13, no. 6-7, pp. 280-294, 2007.
- [34] BD Biosciences, "BD Biosciences Cell Culture." Disponible: <http://www.bdbiosciences.com/cellculture/surfaces/surfacetypes/index.jsp>. [Consulté le 9 août 2012].
- [35] S. P. Massia, "Cell-extracellular matrix interactions relevant to vascular tissue engineering," dans *Tissue Engineering of Prosthetic Vascular Grafts*, P. Zilla et H. P. Greisler, Éd., Austin: R.G. Landes Company/Landes Bioscience, 1999, pp. 583-597.
- [36] Z. Yang, J. Wang, R. Luo, X. Li, S. Chen, H. Sun et N. Huang, "Improved hemocompatibility guided by pulsed plasma tailoring the surface amino functionalities of TiO₂ coating for covalent immobilization of heparin," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 8, no. Compindex, pp. 850-858, 2011.
- [37] J. H. Zhao, W. P. Michalski, C. Williams, L. Li, H.-S. Xu, P. R. Lamb, S. Jones, Y. M. Zhou et X. J. Dai, "Controlling cell growth on titanium by surface functionalization of heptylamine using a novel combined plasma polymerization mode," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 97 A, no. Compindex, pp. 127-134, 2011.
- [38] A. Artemenko, O. Kylian, J. Kousal, A. Choukourov, O. Polonskyi, D. Slavinska et H. Biederman, "Deposition of amino-rich coatings by RF magnetron sputtering of Nylon: Investigation of their properties related to biomedical applications," *Surface & Coatings Technology*, vol. 205, pp. S529-S533, 2011.

- [39] B. Lassen et M. Malmsten, "Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 186, no. 1, pp. 9-16, 1997.
- [40] S. Lerouge, A. Major, P.-L. Girault-Lauriault, M.-A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer et M.-J. Hébert, "Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 1209-1217, 2007.
- [41] S. Rampersad, J.-C. Ruiz, A. Petit, S. Lerouge, J. Antoniou, M. R. Wertheimer et F. Mwale, "Stem cells, nitrogen-rich plasma-polymerized culture surfaces, and type X collagen suppression," *Tissue Engineering - Part A*, vol. 17, no. Compendex, pp. 2551-2560, 2011.
- [42] F. Truica-Marasescu et M. R. Wertheimer, "Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Biomedical Applications," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, no. 1, pp. 44-57, 2008.
- [43] C. Charbonneau, J.-C. Ruiz, P. Lequoy, M.-J. Hebert, G. De Crescenzo, M. R. Wertheimer et S. Lerouge, "Chondroitin Sulfate and Epidermal Growth Factor Immobilization after Plasma Polymerization: A Versatile Anti-Apoptotic Coating to Promote Healing Around Stent Grafts," *Macromolecular Bioscience*, vol. 12, no. 6, pp. 812-821, 2012.
- [44] F. Truica-Marasescu et M. R. Wertheimer, "Vacuum ultraviolet-induced photochemical nitriding of polyolefin surfaces," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, no. 6, pp. 3886-3898, 2004.
- [45] P. A. Ramires, L. Mirengi, A. R. Romano, F. Palumbo et G. Nicolardi, "Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 51, no. 3, pp. 535-539, 2000.
- [46] F. R. Pu, R. L. Williams, T. K. Markkula et J. A. Hunt, "Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro," *Biomaterials*, vol. 23, no. 11, pp. 2411-2428, 2002.
- [47] J.-J. Chen, Q.-P. Ho et M.-J. Wang, "Modulation of cell responses by creating surface submicron topography and amine functionalities," *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, vol. 50, no. 7, pp. 484-491, 2012.

- [48] C. Bergemann, A. Quade, F. Kunz, S. Ofe, E.-D. Klinkenberg, M. Laue, K. Schroder, V. Weissmann, H. Hansmann, K.-D. Weltmann et B. Nebe, "Ammonia plasma functionalized polycarbonate surfaces improve cell migration inside an artificial 3D cell culture module," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 9, no. 3, pp. 261-272, 2012.
- [49] J. Lahann, "Vapor-based polymer coatings for potential biomedical applications," *Polymer International*, vol. 55, no. 12, pp. 1361-1370, 2006.
- [50] J. Byoung-Jin, K. Moo-Hwan et P. Jae-Chul, "Application of a functionalized parylene film as a linker layer of SPR biosensor," *Sensors and Actuators: B Chemical*, vol. 154, no. 2, pp. 89-95, 2011.
- [51] E. M. Robinson, R. Lam, E. D. Pierstorff et D. Ho, "Localized Therapeutic Release via an Amine-Functionalized Poly-p-xylene Microfilm Device," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 37, pp. 11451-11455, 2008.
- [52] Z. Shen, T. Crotti, K. McHugh, K. Matsuzaki, E. Gravallesse, B. Bierbaum et S. Goldring, "The role played by cell-substrate interactions in the pathogenesis of osteoclast-mediated peri-implant osteolysis," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 8, no. 3, pp. R70, 2006.
- [53] C. Shi et E. G. Pamer, "Monocyte recruitment during infection and inflammation," *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 11, pp. 762-74, 2011.
- [54] C. Sundström et K. Nilsson, "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)," *International Journal of Cancer*, vol. 17, no. 5, pp. 565-577, 1976.
- [55] Y.-K. Gong, L. Luo, A. Petit, D. J. Zukor, O. L. Huk, J. Antoniou, F. M. Winnik et F. Mwale, "Adhesion of human U937 macrophages to phosphorylcholine-coated surfaces," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 72A, no. 1, pp. 1-9, 2005.
- [56] E. Yagil-Kelmer, P. Kazmier, M. N. Rahaman, B. S. Bal, R. K. Tessman et D. M. Estes, "Comparison of the response of primary human blood monocytes and the U937 human monocytic cell line to two different sizes of alumina ceramic particles," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 22, no. 4, pp. 832-838, 2004.

- [57] S. M. Algan, M. Purdon et S. M. Horowitz, "Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 14, no. 1, pp. 30-35, 1996.
- [58] N. Ishiguro, T. Kojima, T. Ito, S. Saga, H. Anma, K. Kurokouchi, Y. Iwahori, T. Iwase et H. Iwata, "Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 35, no. 3, pp. 399-406, 1997.
- [59] D. S. Vara, H. J. Salacinski, R. Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton et A. M. Seifalian, "Cardiovascular tissue engineering: state of the art," *Pathologie Biologie*, vol. 53, no. 10, pp. 599-612, 2005.
- [60] M. Deutsch, J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss et P. Zilla, "Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: A 9-year experience," *Surgery*, vol. 126, no. 5, pp. 847-855, 1999.
- [61] P. Feugier, R. A. Black, J. A. Hunt et T. V. How, "Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress," *Biomaterials*, vol. 26, no. 13, pp. 1457-1466, 2005.
- [62] S. C. Heilshorn, K. A. DiZio, E. R. Welsh et D. A. Tirrell, "Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins," *Biomaterials*, vol. 24, no. 23, pp. 4245-4252, 2003.
- [63] N. A. Bullett, D. P. Bullett, F. Truica-Marasescu, S. Lerouge, F. Mwale et M. R. Wertheimer, "Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture," *Applied Surface Science*, vol. 235, no. 4, pp. 395-405, 2004.
- [64] F. Truica-Marasescu, P.-L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W. E. S. Unger et M. R. Wertheimer, "Nitrogen-rich Plasma Polymers : Comparison of Films Deposited in Atmospheric-and Low-Pressure Plasmas," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 21, pp. 7406-7417, 2008.
- [65] J. C. Ruiz, P. L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu et M. R. Wertheimer, "Plasma-and vacuum-ultraviolet (VUV) photo-polymerisation of N- and O-rich thin films," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 79, no. 3, pp. 310-314, 2010.

- [66] Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, "Rapport interne - Parylène," 2008.
- [67] M. Schleicher, J. Hansmann, B. Elkin, P. J. Kluger, S. Liebscher, A. J. T. Huber, O. Fritze, C. Schille, M. Müller, K. Schenke-Layland, M. Seifert, H. Walles, H.-P. Wendel et U. A. Stock, "Oligonucleotide and Parylene Surface Coating of Polystyrene and ePTFE for Improved Endothelial Cell Attachment and Hemocompatibility," *International Journal of Biomaterials*, vol. 2012, 2012.
- [68] Nobelprize.org, "The Nobel Prize in Physics 1981," 2012. Disponible: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1981/. [Consulté le 30 août 2012].
- [69] H. Bubert, J. C. Rivière et W. S. M. Werner, "X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)," dans *Surface and Thin Film Analysis*, G. Friedbacher et H. Bubert, Éd., Weinheim: Wiley, 2011, pp. 9-42.
- [70] D. J. O'Connor, B. A. Sexton et R. S. C. Smart, *Surface Analysis Methods in Materials Science*, Berlin: Springer, 586 pages, 2003.
- [71] D. Briggs, *Surface Analysis of Polymers by XPS and Static SIMS*, Cambridge: Cambridge University Press, 214 pages, 1998.
- [72] J. C. Rivière et S. Myhra, *Handbook of Surface and Interface Analysis: Methods for Problem-Solving*, Boca Raton: CRC Press, 651 pages, 2009.
- [73] J. C. Vickerman et I. Gilmore, *Surface Analysis: The Principal Techniques*, Chichester: Wiley, 686 pages, 2009.
- [74] P. Favia, M. Stendardo et R. d'Agostino, "Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH₃-H₂ RF glow discharges " *Plasmas and Polymers*, vol. 1, no. 2, pp. 91-112, 1996.
- [75] H. Fujiwara, *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*, Chichester: John Wiley & Sons, 388 pages, 2007.
- [76] M. Schubert, "Ellipsometry," dans *Infrared Ellipsometry on Semiconductor Layer Structures*, *Springer Tracts in Modern Physics*, vol. 209, Berlin: Springer, 2005, pp. 7-29.

- [77] Chanli44, "Thin film interference - anti-reflection coating," 2010, Wikipedia. Disponible: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Thin_film_interference_-_anti-reflection_coating.gif. [Consulté le 7 novembre 2012].
- [78] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter, *Essential Cell Biology*, New York: Garland Science, 860 pages, 2003.
- [79] E. Pelt-Verkuil, A. Belkum et J. P. Hays, "The Polymerase Chain Reaction," dans *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*: Springer Netherlands, 2008, pp. 1-7.
- [80] Sigma-Aldrich, "SYBR Green I nucleic acid gel stain." Disponible: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/s9430dat.Par.0001.File.tmp/s9430dat.pdf>. [Consulté le 13 décembre 2012].
- [81] I. M. Mackay, *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*, Norfolk, UK: Caister Academic, 454 pages, 2007.
- [82] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 9, pp. e45, 2001.
- [83] P. L. Girard-Lauriault, P. Desjardins, W. E. S. Unger, A. Lippitz et M. R. Wertheimer, "Chemical characterisation of nitrogen-rich plasma-polymer films deposited in dielectric barrier discharges at atmospheric pressure," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 5, no. 7, pp. 631-644, 2008.
- [84] T. Gross, F. Pippig, B. Merz, R. Merz, U. Vohrer, R. Mix, H. Steffen, W. Bremser et W. E. S. Unger, "Determination of OH Groups at Plasma Oxidised Poly(propylene) by TFAA Chemical Derivatisation XPS: An Inter-laboratory Comparison," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 6, pp. 494-503, 2010.
- [85] Z. Yang, X. Wang, J. Wang, Y. Yao, H. Sun et N. Huang, "Pulsed-Plasma Polymeric Allylamine Thin Films," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 6, no. 8, pp. 498-505, 2009.

- [86] T. Gengenbach, Z. Vasic, S. Li, R. Chatelier et H. Griesser, "Contributions of restructuring and oxidation to the aging of the surface of plasma polymers containing heteroatoms," *Plasmas and Polymers*, vol. 2, no. 2, pp. 91-114, 1997.
- [87] B. Ratner, "The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century," *Journal of Cardiovascular Translational Research*, vol. 4, no. 5, pp. 523-527, 2011.
- [88] B. Finke, K. Schroder et A. Ohl, "Structure Retention and Water Stability of Microwave Plasma Polymerized Films From Allylamine and Acrylic Acid," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 6, pp. S70-S74, 2009.
- [89] K. Bendtzen, "Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity," *Immunology letters*, vol. 19, no. 3, pp. 183-91, 1988.
- [90] C. Elsner, M. Lenk, L. Prager et R. Mehnert, "Windowless argon excimer source for surface modification," *Applied Surface Science*, vol. 252, no. 10, pp. 3616-3624, 2006.
- [91] P. A. Tamirisa et D. W. Hess, "Water and Moisture Uptake by Plasma Polymerized Thermoresponsive Hydrogel Films," *Macromolecules*, vol. 39, no. 20, pp. 7092-7097, 2006.

ANNEXE 1

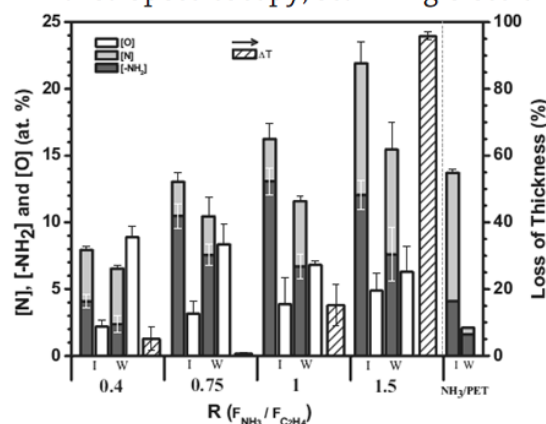
FABRICATION AND CHARACTERISATION OF AMINE-RICH ORGANIC THIN FILMS: FOCUS ON STABILITY

J. C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérésy, S. Lerouge et M. R. Wertheimer, "Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 9-10, pp. 737-753, 2010.

Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability

Juan-Carlos Ruiz, Amélie St-Georges-Robillard, Charles Thérésy, Sophie Lerouge, Michael R. Wertheimer*

Thin films, rich in primary amines ($C-NH_2$), were deposited from nitrogen (N_2) or ammonia (NH_3) and ethylene (C_2H_4) with different gas mixture ratios, R , using three different methods: atmospheric-pressure- or low-pressure plasma polymerisation (PP), and vacuum-ultraviolet photo-polymerisation. They are designated H-plasma-polymerised ethylene (PPE):N, L-PPE:N and ultraviolet-polyethylene (UV-PE):N, respectively. Of interest in cell-culture and tissue engineering, all three coating-types were examined with regard to stability in air and solubility in water, compared with other deposits in the literature that were obtained from single precursors such as allylamine (AA) or *n*-heptylamine (HA), PP-AA and PP-HA, respectively. The three types of deposits, prepared using comparable R values, were characterised by X-ray photoelectron spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and atomic force microscopy and found to vary significantly among themselves in regard to their [N]- and [NH_2] concentrations, and their chemical stabilities during long-term exposures to air or aqueous solvents. UV-PE:N and L-PPE:N films were found to compare very favourably with their best PP-AA and PP-HA counterparts; we conclude that the additional important fabrication parameter (the gas mixture ratio, R) is a major asset for preparing stable NH_2 -rich organic coatings with optimal properties.



Introduction

In recent years, plasma technologies have been extensively used to alter the surface properties of synthetic polymers, so as to elicit desired responses toward biological environments.^[1-3] Many studies have been reported using widely varying approaches and process gases; most of these comprised surface functionalisation, whereby macromolecules in the near-surface region are

J.-C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, M. R. Wertheimer
Department of Engineering Physics, École Polytechnique, C. P.
6079, Succursale Centre-Ville, Montréal, Canada QC H3C3A7
Fax: (+1) 514 340 3218; E-mail: Michel.wertheimer@polymtl.ca
C. Thérésy, S. Lerouge
Department of Mechanical Engineering, École de Technologie
Supérieure (ÉTS), and Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM)
Montréal, Canada QC H3C1K3

modified by adding new chemical groups *via* substitutive radical reactions (so-called grafting);^[1–6] the other category, plasma polymerisation (PP), involves adding a thin organic coating on top of the original surface.^[1–3,6–11] Physico-chemical properties of both types of newly created surfaces, namely chemical functionality, surface energy, roughness, surface charge, etc. are believed to govern their interactions with a given biological environment. Henceforth, we shall mainly focus our attention on the second type of functional surfaces, thin film coatings, but will make occasional reference to grafting. An important class of functional coatings are nitrogen (N)-rich ones,^[1,2,6–15] which have been found to promote cell adhesion,^[6,7,12–15] and even to influence differentiation of mesenchymal stem cells.^[14] This is presumed to be due to the presence of primary amine groups, C–NH₂, and their associated positive charges that may, in aqueous solutions at physiological pH values, attract negatively charged bio-molecules (proteins, DNA) and thus indirectly living cells.^[1–3,6,12–15] Moreover, such amino groups are chemically reactive, and they are used in biochemistry for covalent coupling of proteins in aqueous environments.^[1–3,6] In the category of graft-modified polymer surfaces, a commercial polystyrene culture dish ('Primaria[®]', Becton-Dickinson Biosciences, San Jose CA) that incorporates both the habitual oxygen (O)-based functionalities of other similar commercial products, but in addition N-containing groups, has been reported to possess significantly superior performance for cell adhesion when compared with 'O-only' surfaces.^[16]

Therefore, if one elects the organic coating (e.g. PP) route, the deposit must have a high density of primary/secondary amines to become positively charged in aqueous media, and to enable imine and enamine coupling.^[11] In addition, such a surface layer must be stable in the aqueous media routinely used for cell culture. Now, these two requirements appear to be in conflict, since numerous earlier attempts to increase the density of amine groups [–NH₂], by lowering average plasma power led to water-soluble films.^[1,6,17] Well-known routes for obtaining coatings with high surface concentrations of nitrogen [N], are PP of suitable N-containing precursors (e.g. allylamine, AA),^[1,2,6,9–11,17–21] or the mixture of hydrocarbon and N-containing gases.^[7,8,22–27]

In this study, we used binary gas mixtures comprising ethylene (C₂H₄) and N₂ or ammonia (NH₃), in order to compare certain important physico-chemical properties of resulting 'PE:N' (N-containing 'polyethylene') films; more precisely, we examine two kinds of 'PPE:N' (N-rich plasma-polymerised ethylene), namely those obtained either by conventional low-pressure ('L') radio-frequency (r.f.) glow discharge, hereafter designated 'L-PPE:N',^[25,28] or in a dielectric barrier discharge (DBD) reactor operating at atmospheric ('H', for 'high') pressure (hereafter 'H-PPE:N').^[7,8] A third category of coatings, designated 'UV-PE:N', results

from vacuum-ultraviolet (VUV) photo-polymerisation reactions in the same gas mixtures as those used for producing the 'L-PPE:N' films. UV-PE:N films are also prepared at low pressures, but in a reactor dedicated for VUV-photochemical research, with a choice of several commercial lamps.^[26] In an earlier article^[28] we had already compared H-PPE:N and L-PPE:N films with regard to certain of their structural properties, pointing out that the former can readily be deposited onto thin dielectric substrates such as polymer films,^[7,8] at very high rates and readily scaled up to industrial production capabilities. On the other hand, L-PPE:N films can also be applied onto conductive and/or three-dimensional objects, for example surfaces of medical devices such as stents, stent-grafts,^[29] or others. The latter, and UV-PE:N films, are *a priori* more costly to produce on account of the more expensive vacuum processing and -equipment and, in the photo-chemical case, expensive light sources. However, in high value-added processes, for example those involving biomaterials and substrates for tissue engineering, production costs are not necessarily the dominating consideration, usually less so than performance characteristics of the types that are the focus of the present investigations.

Having stated the above motivation and objectives, we now report a comparison of the three coating families, H-PPE:N, L-PPE:N and UV-PE:N, with regard to key properties that determine the deposits' suitability in biomedical, mostly tissue-engineering, applications. Unlike in the above-mentioned earlier comparison of H- and L-PPE:N coatings,^[28] we focus here on the materials' stabilities in ambient air and in water-based media, using similar approaches to those already reported by several other teams of investigators:^[17–21] the present investigations include studies of ageing in ambient air, solubility measurements in aqueous cell-culture media and studies of structural properties by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) (with and without chemical derivatisation with 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde, TFBA), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), among others. Our results are compared with those reported by other workers.

Experimental Part

Deposition of PE:N Films

Polyethylene:N films were deposited in the three reactor systems depicted in Figure 1, on several types of substrates, including 2 mm thick glass plates, (100)-oriented single-crystal (c-Si) silicon wafers and bi-axially oriented poly(propylene), BOPP (50 µm thick, isotactic polymer film, graciously provided by 3M Company). Surface analyses (see below) were conducted to verify that the deposition rates and chemical compositions of PE:N deposits were independent of their host surfaces.

The L-PPE:N coatings were deposited in a cylindrical aluminium/steel vacuum chamber, approximately 20 cm in diameter and 20 cm

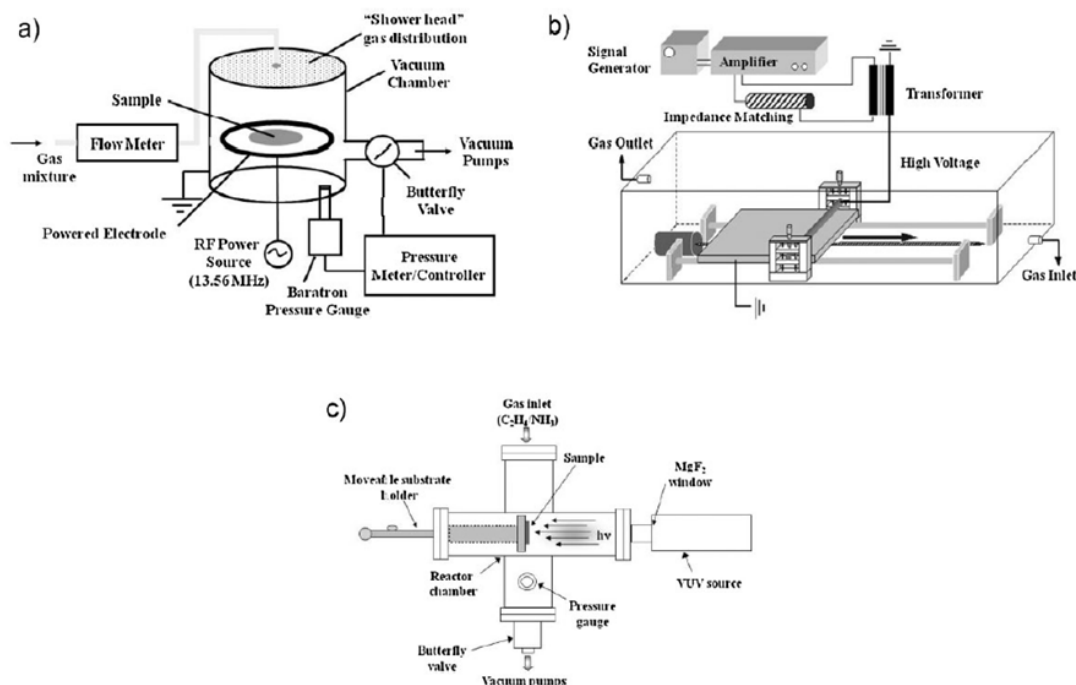


Figure 1. Three reactor systems used in the present research: (a) low-pressure plasma (LP-PECVD), 13.56 MHz r.f. discharge; (b) atmospheric-pressure dielectric barrier discharge (AP-DBD) plasma and (c) vacuum ultraviolet photo-polymerisation (VUV-CVD), see text.

in height (Figure 1a). A turbo-molecular pump, backed by a two-stage rotary vane pump was used to evacuate the chamber to a base pressure of $<10^{-4}$ Pa, as measured by an ionisation gauge. Flows of high-purity feed gases (ethylene 99.5%, and ammonia, 99.99%, Air Liquide, Canada) were then admitted into the chamber using electronic flow meter/controllers (Vacuum General Inc.), and a 'shower head' gas distributor (10 cm in diameter). The flow rate of C_2H_4 precursor, $F_{C_2H_4}$, was kept constant at 20 sccm, while the gas flow ratio $R (=F_{NH_3}/F_{C_2H_4})$ could be varied between 0 and 3 by varying the NH_3 flow rate, F_{NH_3} , between 0 and 60 sccm. The operating pressure, p , during plasma deposition was set and maintained constant at 80 Pa by a butterfly throttle valve, in combination with a capacitive pressure gauge (Baratron, MKS Instruments). The capacitively coupled r.f. (13.56 MHz, ENI) plasma was generated with the help of an automatic impedance matching network (Advanced Energy), connected to the 10 cm diameter powered electrode in the centre of the chamber, the walls acting as the grounded electrode. The distance between the bottom of the shower head and the r.f.-driven electrode was 15 cm. Based on our previous results,^[25,28] we chose to deposit L-PPE:N coatings using rather mild plasma conditions ($P = 10$ W, resulting in a negative d.c. bias voltage, $V_B = -40$ V); under these conditions, polymer-like films with maximum nitrogen [N], and amine $[NH_2]$, concentrations were deposited. In the present work, three deposition conditions were favoured, namely those corresponding to $R = 0.75, 1.0$ and 1.5 , for reasons to be discussed later.

Figure 1b depicts the atmospheric pressure DBD, apparatus used for depositing the H-PPE:N films;^[7,8] it comprised a grounded, planar Al electrode and a cylindrical, dielectric-coated stainless steel high voltage (HV) electrode. The former could be moved at controlled speed under the latter electrode, to simulate continuous treatment conditions akin to those encountered in industrial equipment. A

2 mm thick glass plate was placed directly on the planar Al electrode and it served as a second dielectric layer, as described in detail elsewhere.^[7,8] The discharge zone was an adjustable 1 mm wide gap between the HV electrode and the glass plate; the precursor gas mixture was introduced here using a gas diffuser (not shown in Figure 1b) to ensure the requisite high gas purity. Gas flow rates ($N_2 - 10$ standard L min^{-1} , slm; $F_{C_2H_4} - 20, 50$ and 60 standard $cm^3 min^{-1}$, sccm) were controlled by electronic mass flow controllers. The roughly 1 cm wide plasma zone was generated with a commercial power source and transformer (Enercon Industries, model LM2727-03, 450 kVA maximum output) at a typical frequency of 10 kHz and peak-to-peak voltage of 18 kV. After the carefully pre-cleaned substrate was introduced into the DBD system, the latter was purged with the precursor gas flow for approximately 10 min. The discharge was then initiated and monitored with a digital oscilloscope, the voltage and current being measured with the help of a resistive probe (Tektronix, model P6015A) and a 50 Ω resistor, respectively. The substrate was made to move back and forth under the HV electrode at precisely controlled speed, $10 mm \cdot s^{-1}$, for up to two dozen cycles, depending on the desired H-PPE:N film thickness.

The third experimental set-up, used for VUV photochemical experiments (see Figure 1c) has also already been described in detail elsewhere.^[26] Briefly, it consists of a stainless steel 'cross' chamber, which was first evacuated to a base pressure of about 5×10^{-6} Torr ($\sim 7 \times 10^{-4}$ Pa) using a combination of turbo-molecular and rotary vacuum pumps. In the present VUV photo-polymerisation experiments, we irradiated flows of binary gas mixtures comprising C_2H_4 and NH_3 at low pressure, typically 100 mTorr (13.3 Pa), similar to those used for depositing L-PPE:N, described above. The flow rate of ethylene, $F_{C_2H_4}$, was kept constant at 50 sccm, while that of ammonia, F_{NH_3} , could be varied between 0 and 75 sccm, yielding

values of their ratio, $R (\equiv F_{\text{NH}_2}/F_{\text{C}_2\text{H}_4})$, between 0 and 1.5. However, in the present work a few selected deposition conditions were employed, like in the cases of L- and H-PPE:N above, for the same reasons discussed later. The polymer-like UV-PE:N coatings were deposited on pieces of Si wafer placed at a distance of 4.5 mm facing the VUV source. The non-coherent VUV source used in this research was a commercial lamp (Resonance Ltd., Barrie ON, Canada) based on an electrodeless, r.f. (100 MHz)-powered electrical discharge in Krypton (Kr) gas at low pressure. The gas is contained in a Pyrex ampoule that is sealed with a MgF_2 window (cut-off wavelength, $\lambda_c = 112$ nm), as described in further detail elsewhere,^[26] along with its resonant, quasi-monochromatic radiation, $\lambda = 123.6$ nm.

Characterisations of PE:N Samples

Structures and properties of all three types of PE:N deposits were investigated using a combination of surface-sensitive analytical techniques.

X-Ray photoelectron spectroscopy analyses were performed in a VG ESCALAB 3MKII instrument, using non-monochromatic Mg K α radiation. Spectra were acquired at 0° emission angles, and charging was corrected by referencing all peaks with respect to the carbon (C1s) peak at binding energy, BE = 285.0 eV. The quantification was performed using Avantage v4.12 software (Thermo Electron Corporation) by integrating the area under a specific peak after a Shirley-type background was subtracted, and by using the sensitivity factors from the Wagner table. Standard deviations of N/C and O/C atomic ratios were found to be between ± 0.02 and ± 0.05 , indicating high reproducibility of both the deposition processes and the XPS analyses. Such analyses, carried out as a function of the deposition time, showed that all PE:N materials have a constant chemical composition throughout their thickness. Therefore, for the following chemical analyses, layers of a given thickness were obtained by taking into account the deposition rates (see below) and by appropriately selecting the deposition time.

The surface concentrations of primary amines [$-\text{NH}_2$], were determined by the method of Favia et al.,^[30] using the selective derivatisation reaction of TFBA (Alfa Aesar) vapour with $-\text{NH}_2$ groups at the film surfaces available for this reaction. By this reaction TFBA is covalently linked via imine bonds, whereby [$-\text{NH}_2$] values could readily be deduced from the fluorine concentrations [F], at the surface, determined by XPS. To account for the carbon atoms being added to the surface as a result of the derivatisation reaction, we used formulae presented in ref.^[25,28] The reaction was carried out in a small glass enclosure into which a tiny amount of TFBA liquid was dripped onto a ≈ 1 cm deep layer of 2 mm diameter glass beads. The ≈ 200 nm thick PE:N coatings on microscope glass slides were placed on the layer of glass beads, whereby direct contact between the coated sample surface and the TFBA liquid could be avoided. The glass container was then placed in an oven at 45 °C for the duration of 3 h, which we determined to be the minimum reaction time needed to convert all near-surface amino groups, in accordance with previously reported experiments.^[25,28]

Infrared spectroscopy was also used to elucidate the film structures. PE:N samples were examined using FTIR spectroscopy, performed on a Bio-Rad FTS-3000 Excalibur Series instrument, equipped with a UMA250 FTIR microscope functioning with a cryogenic MCT detector. FTIR spectra were obtained in the

reflection mode, using coatings that had been deposited on silver-coated glass substrates. All spectra were acquired at a resolution of 1 cm^{-1} ; a blank silver-coated microscope slide was used to acquire background spectra. In order to compare the intensities of given bands in a semi-quantitative manner, the thicknesses of PE:N coatings used for FTIR spectroscopy were maintained constant at about 650 nm.

Film thickness, T , and refractive index, n , of PE:N films were measured by ellipsometry in the ultraviolet–visible (UV–Vis), 300–1600 nm range, using a variable-angle spectroscopic ellipsometer (VASE, J. A. Woollam Co., Inc.). Clearly, knowledge of T also permits one to determine deposition rate, r , to be discussed below. Ellipsometric measurements were made at two angles, 65 and 75°, with 10-nm steps in wavelength, the data being simultaneously fitted using the Cauchy dispersion formula for n , and the Urbach tail for k , again with WVASE 32 software. Values of T were also determined by profilometry measurements using a Dektak 150 surface profiler (Veeco); here, coatings deposited on hard surfaces, for example glass, were scratched down to the substrate with a sharp metal tip, following which the step height (thickness) was readily measured with a nominal precision of ± 0.4 nm.

Regarding investigations of the samples' stability (so-called ageing), the principal objective of this current work, two approaches were pursued:

- (i) As already reported in an earlier comparison of H- and L-PPE:N,^[28] some selected PE:N samples were stored in laboratory air for various prolonged periods (up to three weeks), and were then examined by XPS before and after the reaction with TFBA, in order to assess changes in their compositions and structures.
- (ii) The second method involved prolonged exposures of coated substrates to aqueous media, namely 'Milli-Q' (doubly deionised) water and PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) solution. After various periods of immersion (24, 72 and 168 h), the dried samples were examined by Dektak profilometry for changes in thickness due to possible partial solubility. Renewed XPS measurements (with and without derivatisation) and AFM were also used to assess changes in surface-compositions and -morphologies.

Finally, selected samples were examined microscopically, both by SEM and by AFM; the latter technique was used both before and after immersion in Milli-Q water, in all cases with dry specimens in atmospheric air. The respective instruments used were a JEOL model 'JSM-7600 TFE' field-emission SEM, and a Digital Instruments 'Dimension 3100' AFM, with a 'Nanoscope V' control unit, used in Tapping ModeTM.

Results and Discussion

Deposition Rates and Compositions of Pristine PE:N Films

Elsewhere, we have already reported deposition rates, r , for 'L' and 'H'-PPE:N and for UV-PE:N films as a function of the gas mixture ratio, R .^[7,25,26] Values of r were found to systematically decrease with increasing R for the case of

L-PPE:N and UV-PE:N coatings, in agreement with the results of others,^[22–24,31,32] but we limited R to a maximum of 1.5 in the case of UV-PE:N since NH_3 acts as an etchant for organic materials,^[5,31,32] these results suggest that a gradual transition from growth- to ablation (chemical sputtering) regimes took place when increasing the NH_3 concentration in the reactors; at high R , N_2 and volatile cyano-, amino- and hydrocarbon groups were formed during deposition, rather than polymerising precursors.^[31,32] For the case of H-PPE:N, the N_2 flow rate was kept constant at 10 slm, while the C_2H_4 flow rate, $F_{\text{C}_2\text{H}_4}$, was varied between 5 and 60 sccm. Since an increase in R values was achieved here via a decrease in the flow rate of the C_2H_4 precursor gas, r values are also expected to decrease with increasing R . However, this logical trend was found to apply only for $R \geq 250$, while for $F_{\text{C}_2\text{H}_4}$ values higher than 40 sccm ($R < 250$), the opposite trend was observed; for convenience to the reader, we shall be referring to different H-PPE:N deposits not in terms of their ' R ' values, but rather in terms of the corresponding values of $F_{\text{C}_2\text{H}_4}$, i.e. '20, 50, 60 sccm'. Above a certain concentration of polymerising precursors, gas-phase reactions between various hydrocarbon and nitrogen-based species were apparently favoured at atmospheric pressure, which led to stable volatile products and reduced deposition. Nevertheless, dramatic differences in r values between the three deposition processes are noteworthy: in the cases of L-PPE:N and UV-PE:N coatings, $0.6 \leq r \leq 24$ and $8 \leq r \leq 21 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively, while for the H-PPE:N coatings, r values were more than an order of magnitude higher ($60 \leq r \leq 550 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$). This can be explained by the much higher collision frequency and reaction probability of active species at the higher pressure conditions that characterise the DBD reactor. Plasma- (and UV-) polymerisation processes, dominated by reactions of free radicals, are often characterised in terms of the parameter W/F (power input per unit of gas flow). Although not central to the objectives of this article, it is nevertheless interesting to mention that typical W/F values used to deposit PE:N coatings were $\approx 15 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-3}$ for L-PPE:N, and $\approx 0.06 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-3}$ for the two others.

[N] values measured by XPS on UV-PE:N, L- and H-PPE:N samples obtained under corresponding conditions also varied in systematic manners with varying R : [N] up to 40 at.% could be obtained in the L- and H-PPE:N cases, while it was above 22 at.% at the highest R ($=1.5$) used for depositing UV-PE:N; however, since the DBD system employed N_2 as the carrier gas for sustaining the discharges, the minimum [N] value for H-PPE:N coatings was ~ 17 at.%. In contrast, [N] values of the L-PPE:N and UV-PE:N coatings extended down to 0 at.% (case of pure C_2H_4 , i.e. $R=0$) and rose almost linearly with increasing R over the entire ranges we examined. In all cases, some oxygen ($[\text{O}] \leq 6$ at.%) was present, due to reactions between long-lived radicals (trapped inside the deposited material) and unstable

functional groups, created during deposition, with molecular oxygen or water vapour when the films were exposed to the ambient atmosphere.^[1,5,7]

Now, since the focus in the present study resides with investigations of the materials' stabilities, we have elected to work only with limited numbers of sample compositions in the case of each of the three families, namely those presented in the various figures, selected on the basis of highest likelihood for chemical and structural stability. As before, all data relating to r and to sample compositions (values of [N], $[-\text{NH}_2]$ and [O]) were found to be highly reproducible, the same as those reported earlier.^[7,8,25,26,28]

Microstructures of PE:N Films

Figure 2 and 3 show selected, but nevertheless highly representative, micrographic images of PE:N deposits, taken by SEM (Figure 2) and AFM (Figure 3), respectively. Figure 2a–d shows SEM images of H-PPE:N deposits, namely top views (Figure 2a and c) and sectional side views of the fracture surfaces (Figure 2b and d) of both relatively thick deposits on glass substrates. In Figure 2a,b and Figure 2c,d the films were ' $F_{\text{C}_2\text{H}_4} = 20 \text{ sccm}$ ' ([N] = 24 at.%, $T \sim 1.5 \mu\text{m}$) and ' 50 sccm ' ([N] = 18 at.%, $T \sim 0.6 \mu\text{m}$) deposits, respectively. Figure 2e and f shows SEM images of L-PPE:N and UV-PE:N films, respectively; the former is a side view of the fracture surface of the $\sim 1 \mu\text{m}$ thick deposit, the latter a top view of the $\sim 0.6 \mu\text{m}$ coating. In both cases (Figure 2e and f) the films correspond to deposits on pieces of silicon crystal (c-Si) wafers, and both were prepared from mixtures with $R = 0.75$; both deposits are seen to be extremely smooth and featureless at this scale of magnification.

Contrary to their L-PPE:N and UV-PE:N counterparts, the H-PPE:N film surfaces were far from being smooth and featureless; indeed the ' 20 sccm ' deposit (Figure 2a and b; $R = 500$, corresponding to 2000 ppm of C_2H_4 in N_2) manifested a distinct cauliflower-like surface morphology, composed of large (approximately micrometer sized) globular particles. This is symptomatic for growth of macroscopic clusters (particles) in the gas phase, as opposed to surface-dominated reactions, which give rise to the smooth films. The second H-PPE:N coating (Figure 2c and d; $R = 200$, corresponding to 5000 ppm of C_2H_4 in N_2) showed a somewhat smoother, but still quite strongly featured surface, including some more widely dispersed sub-micrometer spheroidal particles. Interestingly, the fracture surface (b) of the former appeared quite smooth and homogeneous, without detectable porosity, while that of the latter (d) did manifest microstructure and some degree of porosity. In a recent report on atmospheric-pressure DBD-deposition of H-PPE:N-like films, also from N_2 - C_2H_4 mixtures, Sarra-Bournet et al.^[27] presented SEM images that strongly resemble those shown here, especially comparing their 2000 ppm mixture

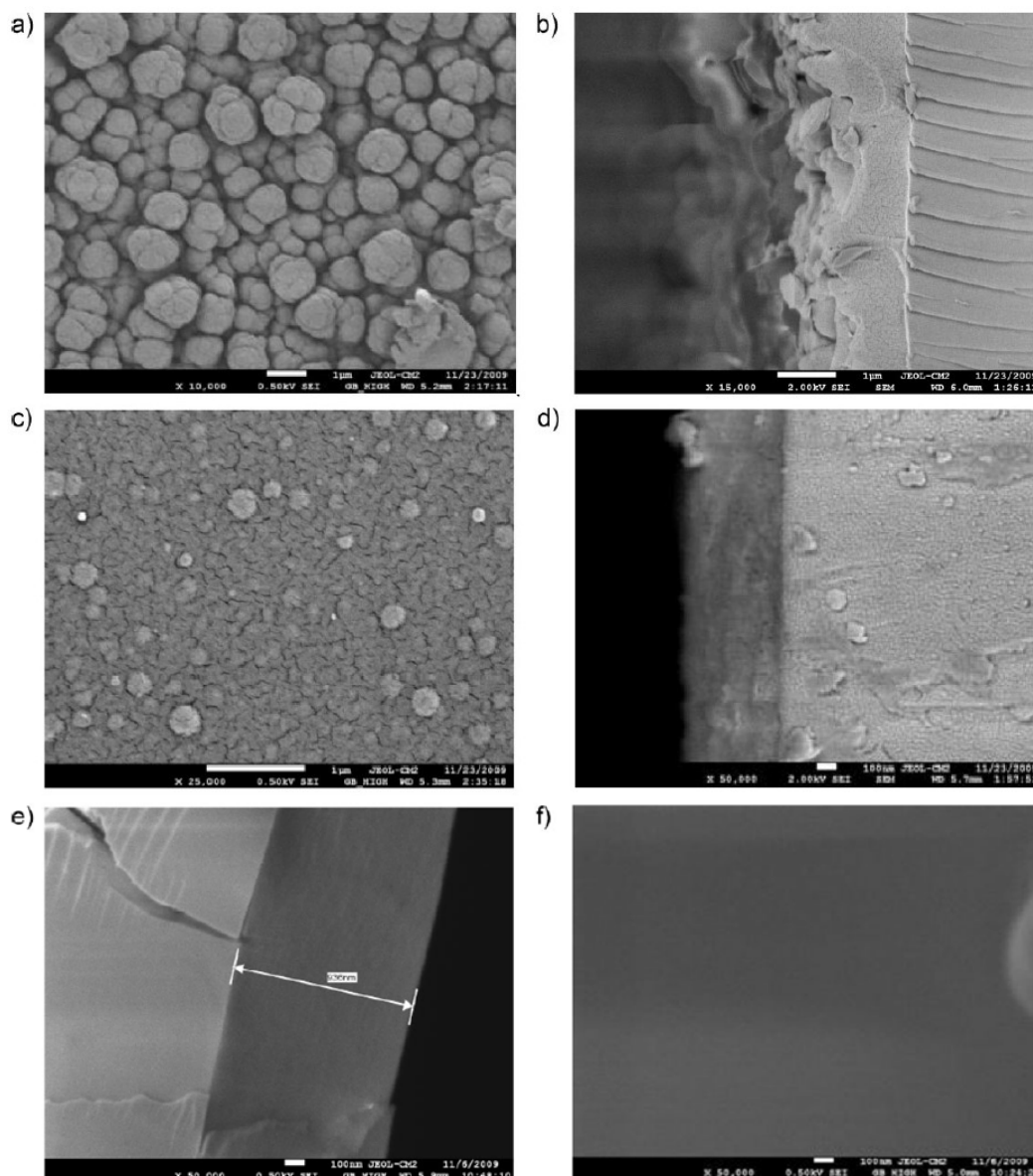


Figure 2. Field emission scanning electron microscopy (SEM) images of H-PPE:N on glass, 20 sccm ($[N] = 24$ at.%, $T \sim 1.5$ μm), (a) surface, (b) cross-section; of H-PPE:N on glass, 50 sccm ($[N] = 18$ at.%, $T \sim 0.6$ μm), (c) surface, (d) cross-section; of (e) L-PPE:N on Si wafer, $R = 1$ ($[N] = 21$ at.%, $T \sim 0.6$ μm , cross-section); and of (f) UV-PE:N on Si wafer, $R = 0.75$ ($[N] = 13.6$ at.%, $T \sim 0.6$ μm , surface).

case with our's (a, b). More will be said further below about the films' morphologies.

Atomic force microscopy images of virgin L-PPE:N and UV-PE:N films (before immersion in Milli-Q water) confirmed that these exhibit smooth surfaces, even at these extreme, near-atomic scale-levels of magnification (Figure 3A and B). Of course, optically smooth c-Si substrates are required for this purpose, and it would be illogical to consider examining the extremely rough H-PPE:N deposits by AFM. The root-mean-square roughness values (R_q) for the virgin films were between 0.20 and 0.31 nm, so that the

absence of surface features in Figure 2e and f noted above are fully confirmed here. Other AFM images in both Figure 3A and B, corresponding to samples after prolonged immersion in water followed by drying, manifested various degrees of roughening (higher R_q values), ranging from 0.37 nm [(Bb), for (0.75)UV-PE:N] to 8.62 nm [(Ae), for (1.5)L-PPE:N]. As will be shown presently, rising R_q values correlate approximately with increasing solubility of the coatings, UV-PE:N with $R = 0.75$ and 1.5 being the least and most soluble materials, respectively. We emphasise that AFM images must be observed with caution, because the 'z'

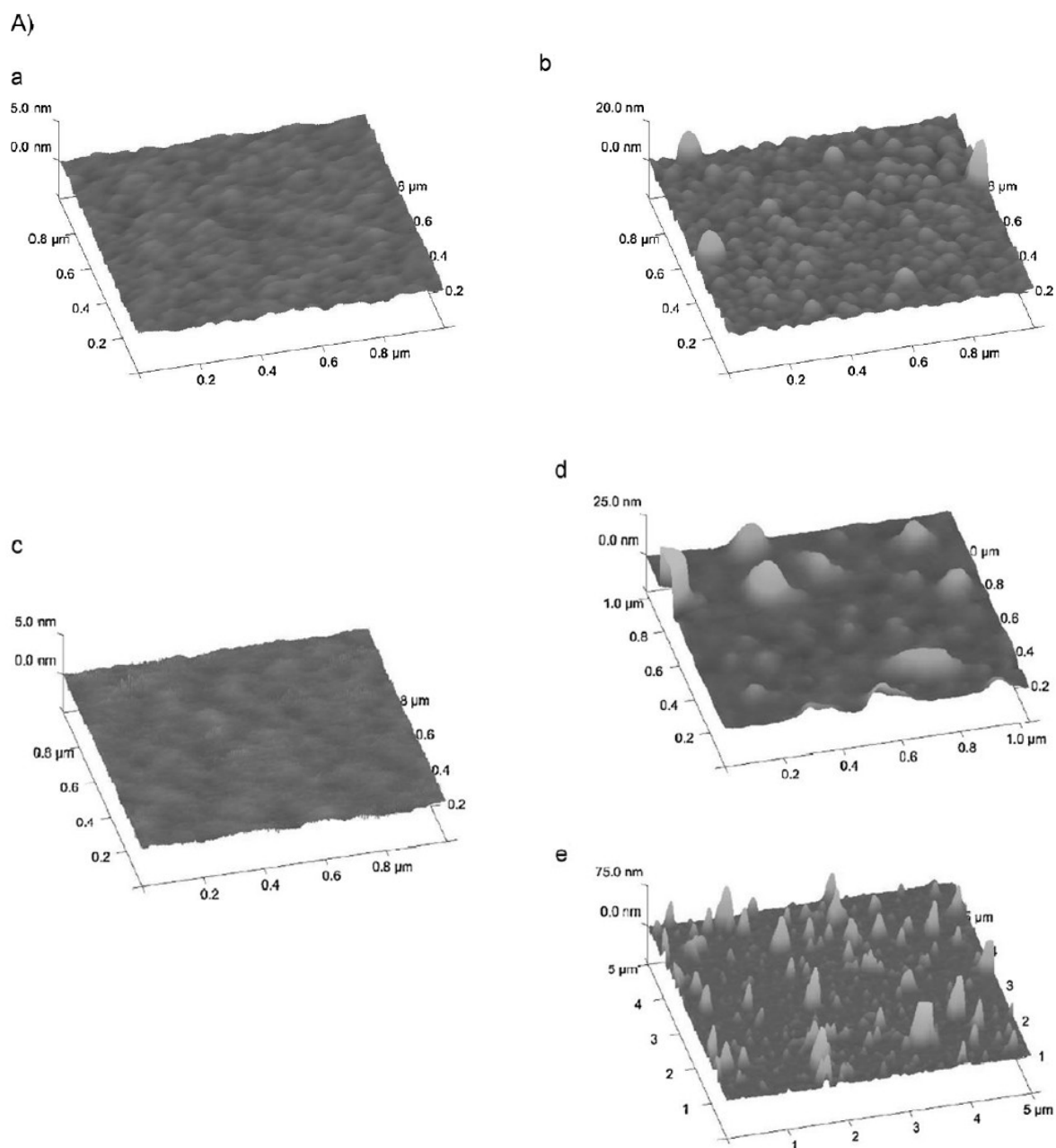
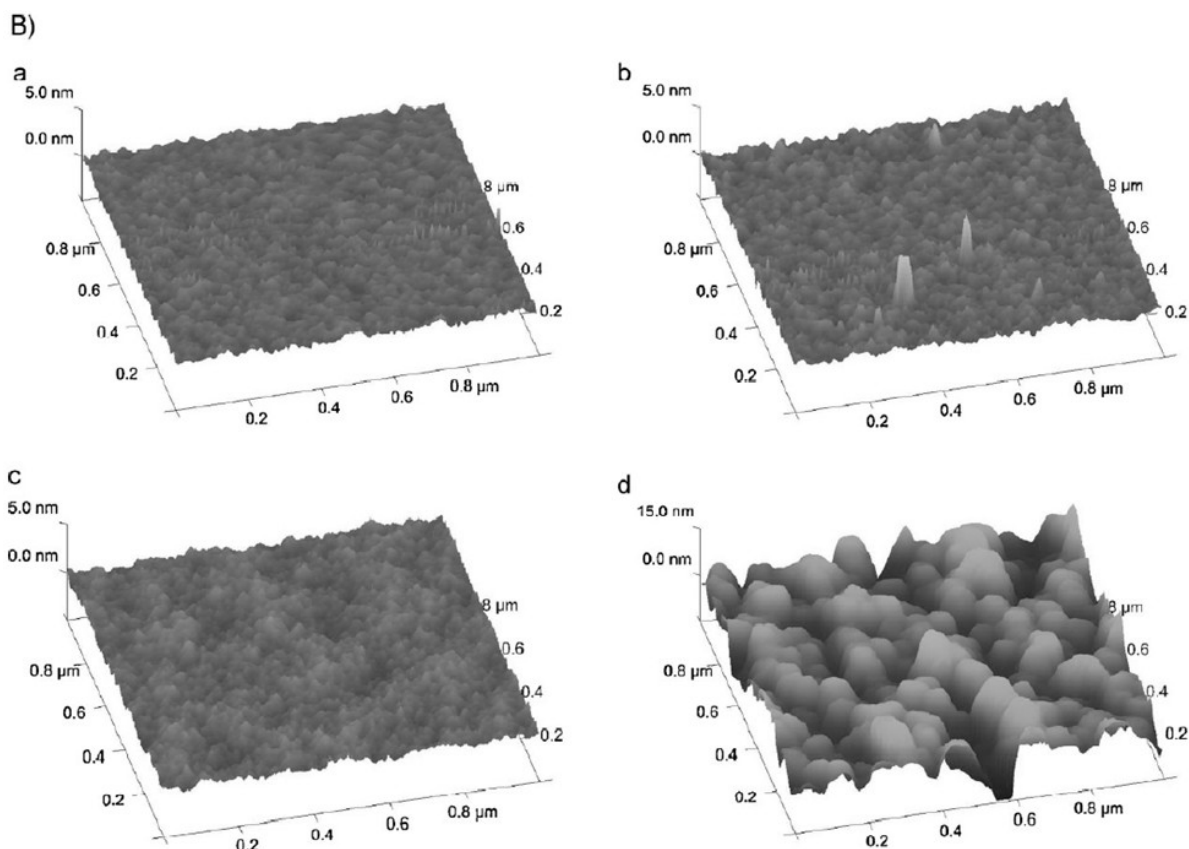


Figure 3. (A) Selected tapping mode AFM images of L-PPE:N ($R = 0.75, 1.0$) coatings on c-Si substrates before and after immersion in Milli-Q water; the last item (1 or 5 μm) represents the size of the imaged field: (a) L-PPE:N, $R = 1$, $T_i = 190 \text{ nm}$, $R_q = 0.20 \text{ nm}$, 1 μm ; (b) $T_i = 190 \text{ nm}$, Milli-Q water for 24 h, $R_q = 1.75 \text{ nm}$, 1 μm . (c) L-PPE:N, $R = 1.5$, $T_i = 201 \text{ nm}$, $R_q = 0.21 \text{ nm}$, 1 μm ; (d) $T_i = 201 \text{ nm}$, Milli-Q water for 24 h, $R_q = 5.35 \text{ nm}$, 1 μm and (e) $T_i = 201 \text{ nm}$, Milli-Q water for 24 h, $R_q = 8.62 \text{ nm}$, 5 μm . (B) Selected tapping mode AFM images of UV-PE:N coatings ($R = 0.75, 1.5$) on c-Si substrates before and after immersion in Milli-Q water; the last item (1 μm) represents the size of the imaged field: (a) UV-PE:N, $R = 0.75$, $T_i = 60 \text{ nm}$, $R_q = 0.28 \text{ nm}$, 1 μm ; (b) Milli-Q water for 24 h, $R_q = 0.37 \text{ nm}$, 1 μm . (c) UV-PE:N, $R = 1.5$, $T_i = 700 \text{ nm}$, $R_q = 0.31 \text{ nm}$, 1 μm ; (d) $T_i = 700 \text{ nm}$, $R = 1.5$, Milli-Q water for 24 h, $R_q = 3.87 \text{ nm}$, 1 μm . Note: T_i refers to the initial thickness of the deposit, before immersion in water.

(height) dimension is very greatly enhanced compared with x and y . Therefore, the 'mounds' observed in (Ad) or (Bd) are much less pronounced, in reality. Comparing (Ad) and (Ae), the very same surface except for the size of the fields imaged

($1 \times 1 \mu\text{m}^2$ and $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, respectively), the same mounds appear as sharp peaks on an otherwise quite smooth background. We believe that these represent agglomerations of lower molecular weight material that accumulate



■ Figure 3. (Continued).

on the surface as the samples dry. Contrary to Vasilev et al.,^[18] our AFM images showed neither nanopores nor delamination from the c-Si substrate that those authors illustrated at the same magnifications, albeit using top-view images.

Stability and Ageing Studies of PE:N Films

Stability in Air

Most of the data we present are in atomic % (at.%), that is, referred to 100 atoms of C, N and O, combined, the elements detected and quantified by XPS. However, in some instances, for example in order to draw comparisons with the literature, concentrations of elements or functional groups are presented with reference to 100 C atoms. We endeavour to always clearly distinguish between these cases. In Figure 4, we present, by way of typical examples for all PE:N materials studied here, the evolutions of $[-\text{NH}_2]/[\text{C}]$ and $[\text{O}]$ for two L-PPE:N samples (Figure 4A: $R = 0.75$, $[\text{N}] \sim 16$ at.%; and Figure 4B: $R = 2.5$, $[\text{N}] \sim 31$ at.%) as functions of storage duration in ambient air. We note very clearly that both those compositional characteristics evolve in a quasi-exponential manner (first-order kinetics) over time, with

typical time constants, τ , of 3–4 d. Not shown here, but noted elsewhere,^[25,28] is the fact that the values of $[\text{N}]$ varied rather little with time, diminishing by only a few percent at most. Although both sets of data manifest considerable scatter (the error bars correspond to standard deviations based on at least three different samples, each one being followed for durations in excess of two weeks), the trends are unmistakably the same in both cases, namely:

- (i) $[-\text{NH}_2]/[\text{C}]$ decreased from their initial high values (about 12% and 30% for $R = 0.75$ and $R = 2.5$, respectively) to asymptotic limiting values of about 3 and 6% after two weeks, respectively. That is, the higher the initial amine concentration, the higher was its residual value after long-term ageing in air.
- (ii) The decreases in $[-\text{NH}_2]/[\text{C}]$ were accompanied by increases in $[\text{O}]$, also exponential, with similar τ values. This strongly supports the view that chemically unstable primary amine groups are converted into stable compounds (e.g. amides or oximes), without appreciable decrease in the overall $[\text{N}]$ value.^[25,28] Possible schemes involving reactions with molecular oxygen or water vapour will be dealt with in the

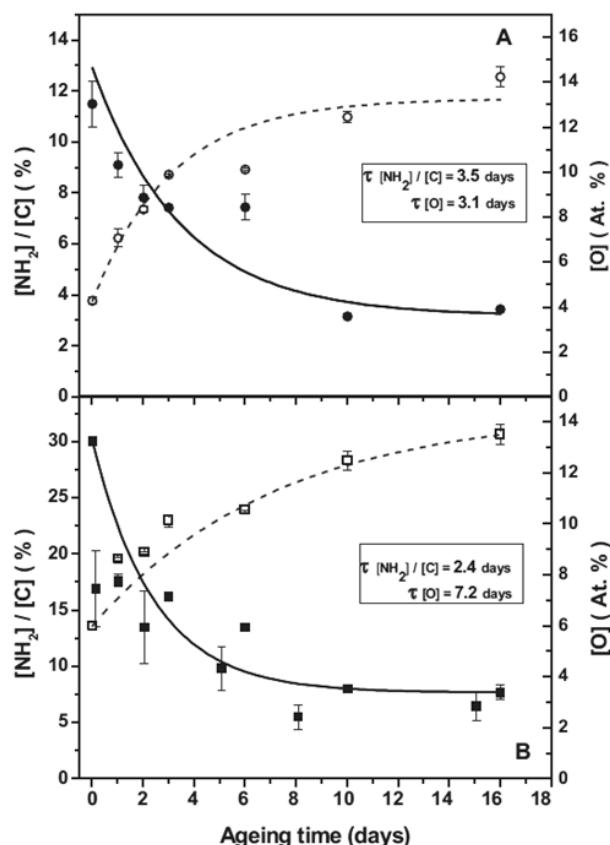


Figure 4. Time-evolutions of the compositions of (A) L-PPE:N ($R=0.75$), and (B) L-PPE:N ($R=2.5$), as a function of the storage duration in laboratory atmosphere. The full and dotted curves are best-fit exponential functions; values of the indicated time constants, τ , are estimated from these.

Discussion Section, along with important results by other workers.

Stability in Water

We now turn to another key issue of this report, partial solubility of PE:N deposits in aqueous media, namely in Milli-Q water and PBS; the latter is a typical water-based solution used in biomedical research and -technology. As stated earlier, several authors have already focused their attention upon this topic, the stability of amine-containing plasma polymer films in water, but most of those studies dealt with materials derived from a single precursor source-molecule, for example AA^[17,19,20,21] or *n*-heptylamine (HA).^[18,19] Other articles, not further mentioned here, have dealt with plasma polymers containing oxygen-functionalities.^[33,34]

Figure 5–8 show the results of the present investigations regarding partial solubility of PE:N films deposited on glass

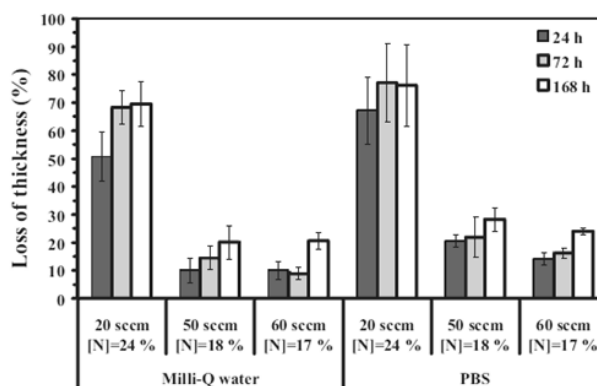


Figure 5. Loss of deposit thickness, T (in percent) after immersion in Milli-Q water and PBS, for three different types of H-PPE:N films, deposited using 20, 50 and 60 sccm of ethylene in N_2 (see text). Exposure times to the solvents were 24, 72 and 168 h.

substrates. At least partial solubility of plasma polymer films that contain high concentrations of polar moieties is to be expected, since the deposition mechanisms involve formation of highly soluble, low molecular weight fractions ('oligomers') that are readily extractable in polar solvents such as water.^[17,18,21] As already mentioned in the subsection on film-characterisations, solubility was determined here by measuring loss of film thickness, T (evaluated by Dektak profilometry) after immersions in water or PBS for duration ranging from one day (24 h) to one week (168 h). Each experiment was accompanied by XPS-based determinations of film compositions, more precisely, measurements of $[N]$ and $[NH_2]$. Figure 5 and 6 pertain to H-PPE:N films, namely to three materials prepared from 20, 50 and 60 sccm C_2H_4 mixtures with N_2 . Figure 5 shows histograms of percent thickness lost after immersions for the indicated durations, while Figure 6 represents $[N]$ and

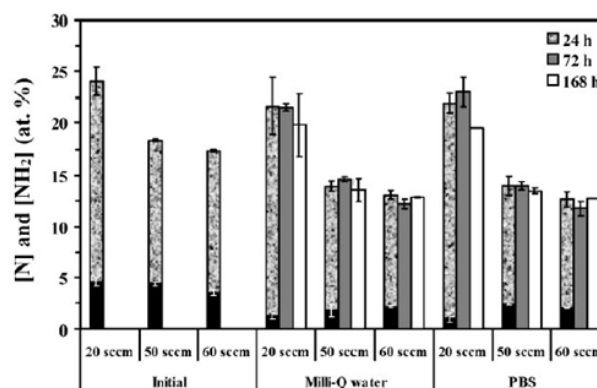


Figure 6. Evolutions of $[N]$ (light grey) and $[NH_2]$ (black) concentrations after immersion in Milli-Q water and PBS, for three different types of H-PPE:N films, deposited using 20, 50 and 60 sccm of C_2H_4 in N_2 (see text). Exposure times to the solvents were 24, 72 and 168 h.

[NH₂]-compositional evolutions (the latter represented by the dark bars superposed on their lighter counterparts), also in the form of histograms. Error bars represent standard deviations from at least three identical sets of experiments. Figure 7 and 8 portray the same types of experiments, this time for the cases of three L-PPE:N film compositions, $R = 0.75, 1.0$ and 1.5 .

As expected (cf Figure 5 and 7), the higher the initial value of [N] (or [NH₂]), the more soluble (i.e. the higher the percent loss of thickness) were the deposits. However, for the 50 and 60 sccm H-PPE:N and the $R = 0.75$ L-PPE:N samples, the observed losses in T , in all cases below 30% after 168 h in both solvent media, were judged to be acceptable for many practical applications in these laboratories. Of course, this

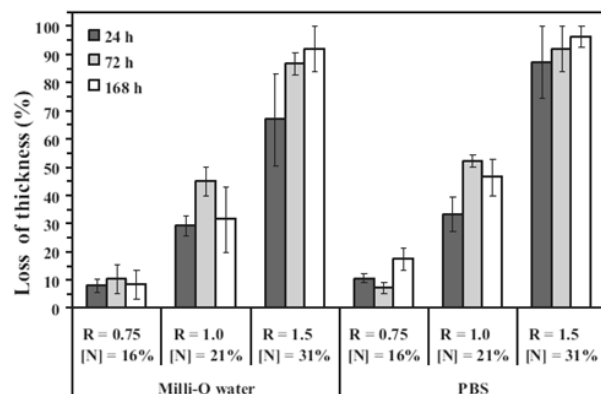


Figure 7. Loss of deposit thickness, T (in percent) after immersion in Milli-Q water and PBS, for three different types of L-PPE:N films, deposited using $R = 0.75, 1.0$ and 1.5 (see text). Exposure times to the solvents were 24, 72 and 168 h.

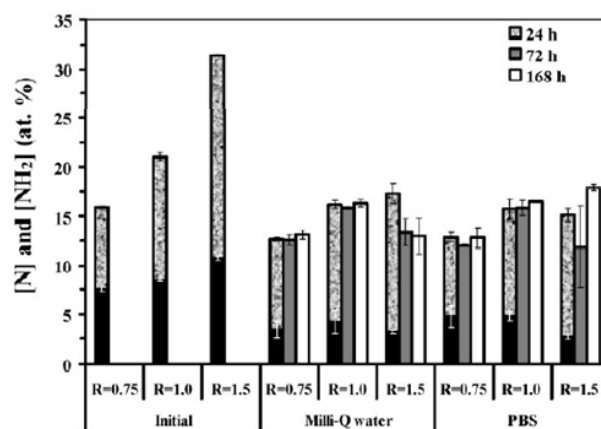


Figure 8. Evolutions of [N] (light grey) and [NH₂] (black) concentrations after immersion in Milli-Q water and PBS, for three different types of L-PPE:N films, deposited using $R = 0.75, 1.0$ and 1.5 (see text). Exposure times to the solvents were 24, 72 and 168 h.

statement is also contingent on the outcomes of the accompanying XPS measurements depicted in Figure 6 and 8, where the corresponding samples were found to have undergone tolerable reductions in both [N] and [NH₂] values. The best-performing material (0.75)L-PPE:N, for example suffered a maximum loss of about 10% in T after 168 h in PBS, and its values of [N] and [NH₂] decreased from 16 to ~12.5%, and from 7.5 to ~5%, respectively. In other words, the indicated samples from those two classes of PE:N materials were found to display overall properties that we consider satisfactory compromises in the cell- and tissue culture research we pursue.

The third PE:N family, films of UV-PE:N, can presently be fabricated only on small-area (ca. 1 cm²) samples per deposition run, on account of the available VUV lamps' small MgF₂ windows and the stationary substrate holder. However, a new mobile (conveyor-type) design is currently being implemented, which will allow a ~1 cm-wide flexible ribbon-substrate to be coated in a given deposition run, yielding a roughly 25-fold increase in coated area. In Figure 9 we present data that were obtained with small (~1 cm²) coated c-Si samples, pertaining to the cases of four

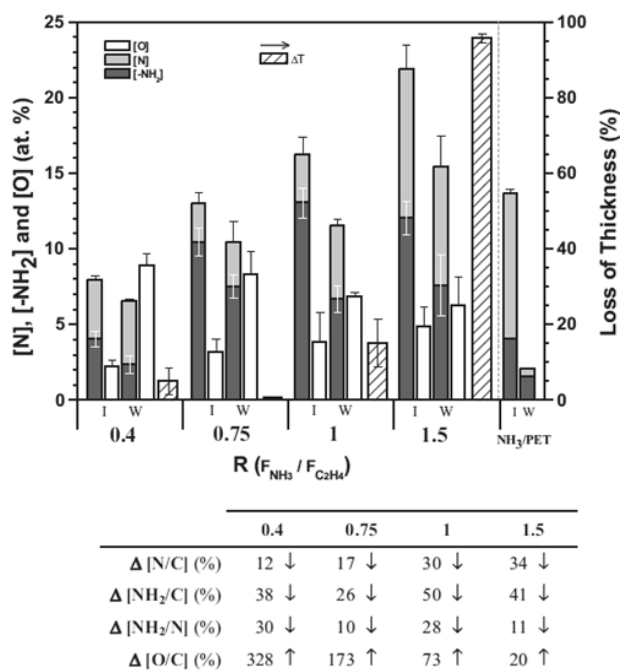


Figure 9. Compositions ([N], [NH₂] and [O]) of four different UV-PE:N coatings, deposited using $R = 0.4, 0.75, 1.0$ and 1.5 , before ('I' for 'initial') and after ('W' for 'water') immersion in Milli-Q water for 20 h; also shown are the corresponding thickness losses (right ordinate axis, hatched bars). The set of data on the extreme right-hand side represent graft-treatment of PET in NH₃ plasma (15 min), before and after immersion in Milli-Q water for 2 h. In the tabulation below the figure, we show relative changes (in percent) of the indicated compositional characteristics after 20 h of immersion. The arrows indicate trends with additional time.

different UV-PE:N samples, $R = 0.4, 0.75, 1.0$ and 1.5 ; also shown (last column on extreme right) are results pertaining to PET polyester film that was graft-modified in low-pressure NH_3 plasma. In all cases 'I' and 'W' refer to 'Initial' and 'Water' (i.e. after immersion), respectively. The hatched bars correspond to T loss (in percent) for each value of R , see right-hand ordinate axis. We will comment on the tabulation shown below Figure 9 later, in the Discussion Section. Comparing these UV-PE:N data with their L-PPE:N counterparts above, in all cases smooth, featureless films prepared by the two vacuum processes, we note important differences: for example, the $R = 0.75, 1.0$ and 1.5 UV films contained less [N] than their L-PPE:N counterparts ($\sim 13, 17$ and 22 at.%, vs. $\sim 16, 21$ and 31 at.%, respectively), but the $[\text{NH}_2]$ values were higher in the former ($\sim 10.5, 13$ and 12 at.%, vs. $\sim 7.5, 8.5$ and 12 at.%, respectively). As we already pointed out elsewhere,^[26] this bears witness to the fact that VUV photochemistry appears to be a far more selective process than plasma chemistry: for the production of the desirable $-\text{NH}_2$ functionality, the highest value of $[\text{NH}_2]/[\text{N}]$ that we measured was $\sim 75\%$.^[26] This is not entirely surprising, considering that reaction pathways initiated by bond-breakage *via* mono-energetic (monochromatic) photons are far fewer than those initiated by molecular collisions with 'hot' electrons that possess Maxwell-Boltzmann-like electron energy distribution functions (EEDFs).^[35] Even more remarkable in Figure 9 is the fact that loss in T was very small for samples with $R \leq 1.0$: the 0.75 material proved to be practically insoluble after 24 h in Milli-Q water, and $[\text{NH}_2]$ ($=8.1\%$) had decreased little from its initial value (compared with $<4\%$ for its L-PPE:N counterpart). These results suggest that this coating owes its remarkable physical and chemical stability to a particularly high degree of cross-linking, which in turn originates from unique characteristics of the photopolymerisation process. The latter statement, tentative as it may be at this stage, also seems to be borne out by the $R = 1.5$ data set in Figure 9: compared with (1.5)L-PPE:N, [N] and $[\text{NH}_2]$ values differed, too (~ 22 and 31 at.%; 12 and 12% , respectively), but unlike all other PE:N films this material proved to be extremely soluble, with $\sim 96\%$ loss of T in water after 24 h. The tentative interpretation of this unusual result is that the available energy from the VUV lamp, two orders of magnitude less than that in the low-pressure plasma (<100 mW vs. ~ 10 W), was insufficient for cross-linking and led to a short-chain (oligomeric), soluble deposit for this particular R . Our currently ongoing research aims to investigate these hypotheses further.

Chemical Structures of PE:N Films

In preceding sections we have already made extensive reference to the systematically varying relationships between film compositions in any given one of the three

PE:N families, and the corresponding R values used to prepare those deposits. Evidently, compositions were determined mostly by surface-specific XPS techniques, under the well-founded supposition that surface- and bulk values differed only slightly (mostly *via* more rapid oxidation of surface-near radical sites and/or unstable groups). For the case of time-dependent variations like those illustrated by ageing in atmospheric air (cf. Figure 4) or immersion in water or PBS (cf. Figure 6, 8 and 9), oxygen and water molecules had more than enough time to diffuse throughout the films' thicknesses, even if these were several μm (cf. Figure 2), because all polymers, even the present more densely cross-linked materials, are quite permeable towards small molecules like O_2 , H_2O , etc.^[36] Systematic trends in chemical stabilities among the three PE:N families were already noted in the preceding sections, namely (in the order of decreasing stability): UV-PE:N $>$ L-PPE:N $>$ H-PPE:N, with certain obvious exceptions. The lower stability of H-PPE:N might possibly be linked with its more porous structure (higher surface-to-volume ratio) evidenced in Figure 2. The stability trend presented above is confirmed in part by FTIR spectra presented in Figure 10, which represent three samples of comparable thicknesses ($T \sim 600\text{--}750$ nm; two with $R = 0.75$ and one $R = 1.0$) before and after immersion in water. The reader is referred to the

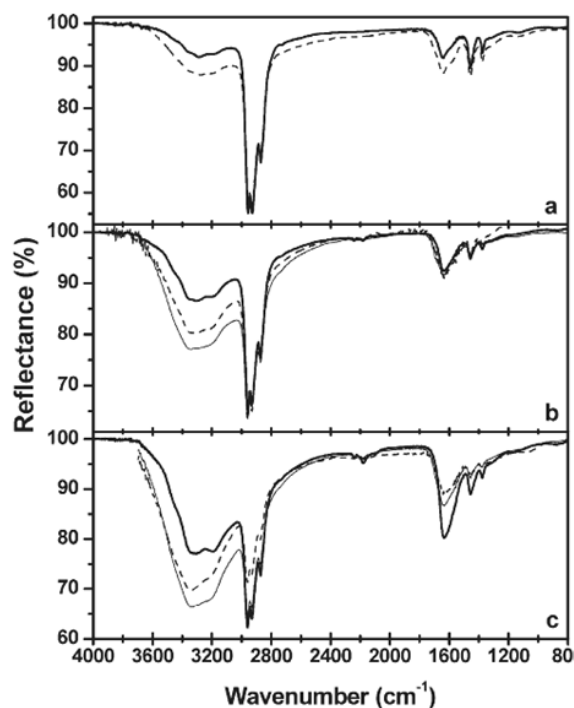


Figure 10. Fourier transform infrared (FTIR) reflection/absorption spectra for: (a) UV-PE:N ($R = 0.75$, $T = 750$ nm) before (—) and after immersion in Milli-Q water (---) for 24 h; (b) L-PPE:N ($R = 0.75$, $T = 600$ nm) and (c) L-PPE:N ($R = 1.0$, $T = 600$ nm) before (—) and after immersion in Milli-Q water (---) or PBS solution (—) for 24 h.

literature, for example to our own earlier articles, for detailed assignments of the observed spectral bands.^[8,25,28] For the (0.75)UV-PE:N sample (Figure 10a), the 3100–3600 cm⁻¹ absorption band (hereafter 'A': OH stretch vibrations, due to oxidation), and the one at 1640–1670 cm⁻¹ ('B': C=O stretch in unsaturated ketones, amides; and C=N stretch in imines and oximes) are seen to have increased only slightly in amplitude, contrary

to their counterparts in Figure 10b [(0.75)L-PPE:N] and Figure 10c [(1.0)L-PPE:N], where the amplitudes of those same bands are seen to have risen ('A') and decreased ('B'), respectively. The absorption band due to nitrile (C≡N) and isonitrile (N≡C) stretch vibrations ('C': 2250–2100 cm⁻¹) is quite strong in spectra (b) and (c), but undetectable in (a). Figure 11 and its accompanying tabulation shows high-resolution C1s, N1s and O1s spectra of (0.75)UV-PE:N (cf.

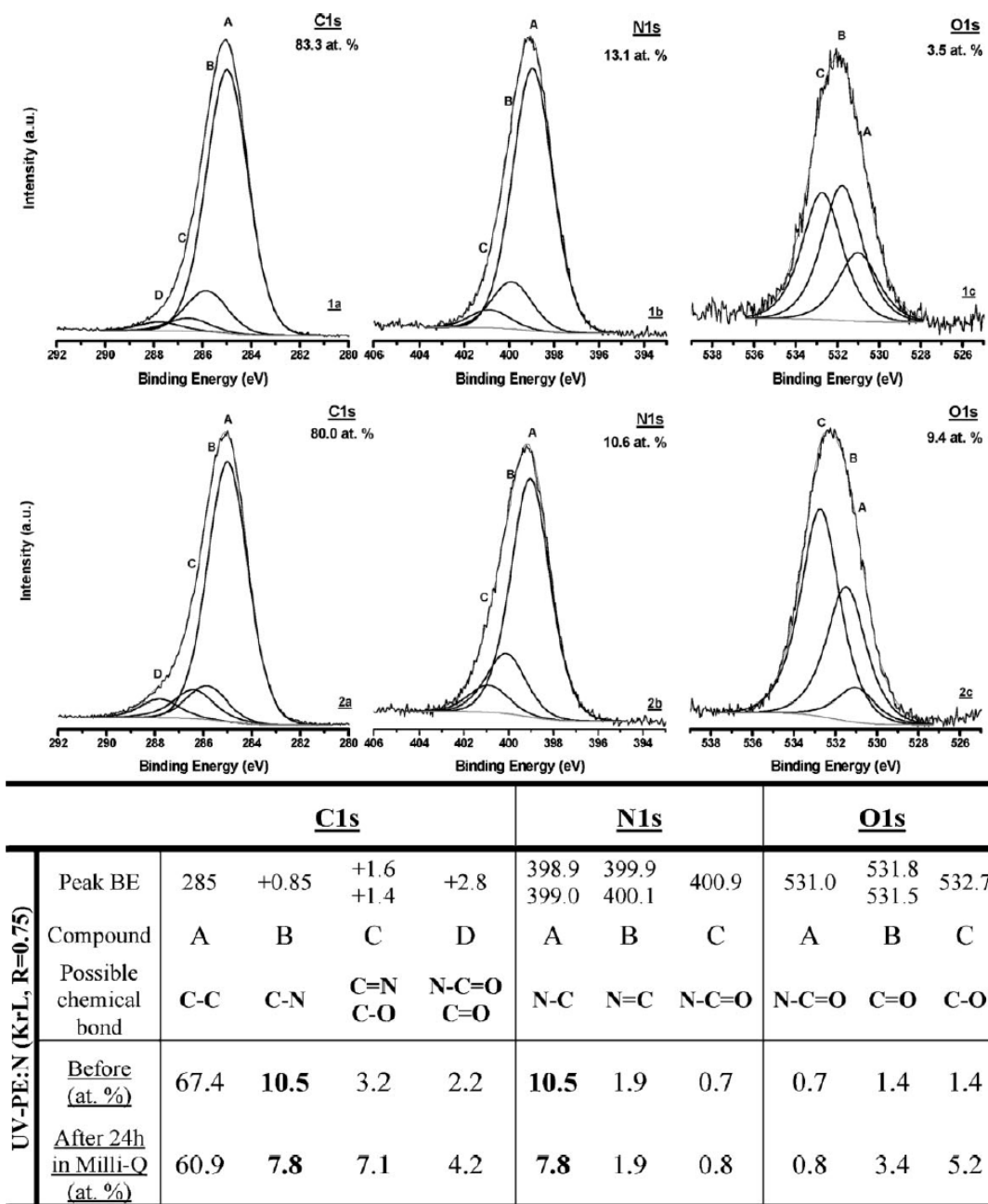


Figure 11. High-resolution XPS spectra of a UV-PE:N deposit ($R = 0.75$); (a) C1s spectra; (b) N1s spectra; (c) O1s spectra, before (1) and after (2) immersion in Milli-Q water for 24 h (see table for relative contributions of each bond type, resulting from spectral de-convolution).

corresponding FTIR spectra in Figure 10a) before and after immersion in water. We recall, preceding section, that this particular material manifested negligible mass loss; therefore, the observed spectral differences must represent *genuine* changes in the sample's chemical structure, not possible artefacts that might result from a loss of extractable oligomers to the (water) solvent. The tabulated abundances of the various bond types indicate the following:

- (i) C–N (e.g. amines) decreased significantly (from 10.5 to 7.8 at.%);
- (ii) this was accompanied by an increase in C=N, and N–C=O (by a total of ~6 at.%);
- (iii) the overall [O] uptake was about 5.9 at.%.

Possible interpretations and mechanisms responsible for ageing phenomena in air and in water, along with other key issues arising from this and the preceding sections, will now be the objects of the following general discussion.

General Discussion and Conclusion

As stated in the Introduction, there is great interest in producing stable, amine-rich surfaces for a wide variety of uses, many in biotechnological applications.^[1–3,6,9] In these laboratories, we have reported the use of PE:N films for culturing cells of importance in orthopaedic medicine,^[7,12–14] in cardiovascular medicine,^[29] and for protein synthesis,^[37] to cite only a few examples. In some of these cases, it was found that high surface concentrations of primary amines [–NH₂] were a prerequisite for cell-adhesion, for example in certain chondrocytic cell lines,^[7] or for human U-937 monocytes.^[7,13] The latter case represents an extreme example, because it was found that no adhesion at all occurred if [–NH₂] < 4.2 at.% (per 100 atoms of C, N and O, combined).^[13] Friedrich et al.^[9] also strive for high concentrations of 'mono-functional' coatings, but their application is as adhesion-promoting primer layers for metallised plastics.

Therefore, it is hardly surprising that numerous authors have confronted the issue of fabricating amine-rich surfaces (of course, also ones with other types of functionalities, mostly with O). In many cases this was done by implementing plasma-based techniques, notably plasma-assisted chemical vapour deposition (PECVD, a more general term for PP). Obviously, many of those published reports focussed to some extent on the important question of stability in air and in polar liquids, particularly in aqueous media.^[6,9,17–21] As stated earlier, most other workers have tended to use single precursor compounds that already incorporate the desired functionality (primary amines in the present instance), for example AA,^[2,6,9,17,19,20,21] HA,^[2,6,18,19] diaminocyclohexane

(DACH),^[2] ethylenediamine,^[2] among others.^[2,6] Higher values of [–NH₂] were achieved by appropriate choices of the plasma parameters, for example by varying or pulsing the applied plasma power.^[17,18,21] Several authors reported finding that high [–NH₂] retention correlated with films that were rich in oligomer content, and concomitant high solubility. In this laboratory, we have deliberately chosen to deal only with mixtures of two feed gases for producing PE:N films, one as the source gas for polymerisation (here, C₂H₄), the other as the source of N-functionality (here, NH₃ or N₂). This methodology has been successfully demonstrated by Hegemann and coworkers,^[22–24] at least in the context of low-pressure PECVD. To the best of our knowledge, our laboratory was the first to apply atmospheric-pressure DBD for producing PE:N and related organic deposits for use in biotechnology,^[7,8] but others are now reporting similar methods.^[27] We are certainly the first to report the VUV photo-polymerisation technique.

Having stated the above, one can now justifiably ask the question which approach, single or multiple precursor gas(es), leads to better-performing bio-functional surfaces in terms of [N], [–NH₂] values and stability. Several authors^[1,2,9,17–21] have recently reported studies of these properties on hand of PP coatings of AA and HA. Tarasova et al.^[19] found their fresh PP-AA and PP-HA films to comprise 17.6 and 8.7% [N] (per 100 C), respectively, accompanied by the usual ~4% [O], while Friedrich et al.^[9] measured up to 37% N/C and 14% NH₂/C in PP-AA. The latter value was found to decrease to about 7% after 16 h wash in absolute ethanol. While the preceding teams of authors, like us, used 13.56 MHz r.f. power, either CW or pulsed, Finke et al.^[21] reported properties of microwave (2.45 GHz) PP-AA films, for example a coating having N/C, NH₂/C and O/C values of ~22, 2.5 and 13%, respectively. After ageing in water for 24 h, the above-mentioned films of Tarasova were found to have the following compositions: [N] = 16.3 and 7.9%, but the [O] values had risen very markedly, to 20.5 and 10.4%, all for PP-AA and PP-HA, respectively. The compositions of Finke's films were also found to have evolved very significantly after immersion, to ~2, 0.5, and 15%, respectively, as did the corresponding FTIR spectra, similar to those shown in Figure 10b. They underline the fact that their highest observed retention of amines was a mere 2.4% NH₂/C. Tarasova et al.^[19] present curve-fitting results of high-resolution C1s and N1s XPS spectra before and after ageing in water, along with colloid probe AFM measurements to monitor the samples' surface potentials while immersed. They conclude that the films oxidised quite rapidly in water, resulting in shifting of the C- and N-groups to higher oxidation states such as amides, esters and carboxylic acids. The surface potential measurements revealed that the initially positive (~+50 mV) values, associated with protonated amine groups, became negative (–54 mV) after 24 h as a result of that oxidation. In

another study, Vasilev et al.^[18] used AFM to demonstrate that PP-HA films became nanoporous when extractable material escaped during immersion in water. Foerch and coworkers,^[1,17] using surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy, also showed that thin PP-AA films deposited at low r.f. power lost extractable material during immersion in water, while films deposited at higher power were more stable due to higher cross-link density.

While the reports cited above clearly prove partial solubility, we believe that the present measurements of thickness loss in relation with film composition (Figure 5, 7 and 9) are among few of their kind, beside data for PP-HA presented by Vasilev et al.^[18] they report thickness decreases from ~5 to ~55% as the plasma power was decreased from 50 to 10 W. Comparing the relative merits of single *versus* multiple precursor gases, the following can now be said, based on results described above: the best literature data for PP-AA appear to be N/C ~0.22, and NH₂/C ~0.07, after immersion, for the case of coatings that were stable enough in aqueous media to be useful for cell colonisation. The best-performing PE:N films in the current work appear to be (0.75)UV-PE:N: before (after) 24 h immersion in water, we found N/C = 15.6% (12.5%); NH₂/C = 12.9% (9.3%), the coating being almost totally insoluble (cf. Figure 9). The best L-PPE:N, also with R = 0.75, had N/C = 20% (16%), NH₂/C = 9.5% (4.4%) and a tolerably low loss of T (~8%) (cf. Figure 7). In other words, the current methodology of using feed-gas mixtures with controllable R appears at least equal, if not superior, when compared with the traditional (single precursor) approach, because R offers an important additional parameter for achieving coatings with an optimal balance of properties.

Although their PP-AA films can evidently undergo quite severe [–NH₂] losses during immersion in water, Finke and coworkers^[15] nevertheless found them to be adequate substrates for colonisation by osteoblasts. Vasilev et al.^[18] also point out that surface density of amines rarely presents problems for them, contrary to coating instability in aqueous media. However, our examples of chondrocytes and U-937 monocytes mentioned above^[7,13] point to the indispensable need for high [–NH₂] values in some bio-applications, and this applies also to adhesion-promoting layers.^[9] Irrespective of the methodology used to produce the films, functional plasma polymers are far superior in regard to all above-considered criteria, when compared with polymer surfaces that have been plasma-grafted in non-polymerising gases, for example N₂ or NH₃ alone:^[1,2,4–6,38,39] this is clearly borne out by the last column of Figure 9 for NH₃ plasma-modified polyester (PET): these results, presented in detail elsewhere,^[38] are in good agreement with similar work on NH₃ treatment of PET published several years ago.^[39] Boucher et al. show that NH₃ plasma-grafting in the reactor of Figure 1a led to optimum [N] and [NH₂] values of 13.7 and 4.2% before immersion in

PBS, numbers that dropped to 1.9 and 1.3% after immersion, respectively. Nevertheless, even that low [NH₂] value proved useful for eventual colonisation with human epithelial corneal (HEC) cells.^[38]

Having addressed stability and ageing of amine-bearing coatings when immersed in aqueous media (or sometimes in ethanol^[1,9]), let us now turn to their behaviour in ambient air. Clearly, the same reactive molecules, O₂ and H₂O, are present in both, except that their relative abundances are reversed. Nevertheless, water and PBS both contain enough dissolved O₂ to react with free radicals, primary amines or other unstable groups in the coatings. The important difference is that the films can undergo mass loss (of extractable species) to the polar solvent, water or ethanol. On the contrary, in air they may experience a slight mass gain due to oxidation. Gengenbach et al.^[40] reported detailed studies of oxidation and restructuring of various plasma polymers, including PP-AA, PP-HA and others, when these films were stored in air for periods ranging up to four years. Using XPS, the authors tracked the evolutions of total N/C and O/C values with time, but not the concentrations of particular functional groups such as [–NH₂]. For PP-AA and PP-HA they found initial N/C values of 0.153 and 0.085, respectively, comparable to those of Tarasova et al.^[19] mentioned above. While the former value remained unchanged over two months, the latter was found to decrease very slightly (to 0.071). However, for PP-HA, O/C rose very rapidly during the first week (from ca. 0.02 to 0.13), then more gradually to >0.25 after one year. In the case of PP-AA, O/C values rose to 0.049, 0.073 and 0.111 after four, six and sixty-eight d, respectively, somewhat less rapidly than in PP-HA. Friedrich et al.^[9] also reported O/C of their PP-AA to rise from 0.02 to ca. 0.16 within 20 d. For the case of L-PPE:N we had earlier reported similar observations, namely a very slight (~7%) relative decrease in [N], but a sharp (~100%) rise in [O] during the first week.^[25,28] In that same report, we also noted that the residual [NH₂] value after long-term storage in air was directly related to the films' initial amine concentrations, an observation we can confirm here, too (cf. Figure 4). In other words, if one foresees using amine-rich coatings only some lengthy period after their preparation, it is definitely advantageous to access a fabrication technique that leads to the best shelf-life results. The work presented here suggests that VUV photo-polymerisation is potentially a very promising candidate. Another amine-rich material, one that is commercially available, is aminomethyl-[2-2]paracyclophane^[41] (Parylene 'diX AM', Kisco Conformal Coating LLC). In a recent article, Miwa et al.^[42] describe its use in an adhesion-based cell-separation device. As described elsewhere,^[43] we have measured the concentrations of primary amines and of oxygen in thin coatings of this material, as well as their time dependences during storage in air. Starting from an initial maximum value [NH₂]/C = 6.5%

(slightly higher than the calculated N/C, 0.059^[41]) for pristine Parylene diX AM coating, this and [O]/C (~0% at $t = 0$) were found to behave much like their counterparts in Figure 4. The only important difference was twofold higher time constants, i.e. $\tau \sim 7.2$ d, in the case of Parylene. An additional noteworthy observation was that the $\{[\text{NH}_2]/\text{C}\}(t)$ and $[\text{O}](t)$ curves, both near-perfect exponential functions with quasi-identical τ values, were mirror images of one another. In other words, each disappearing amine was found to result in the uptake of exactly one O atom in the film structure.^[43] More will be said about this in the following paragraph.

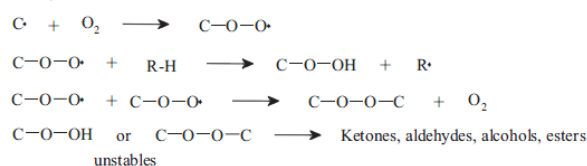
Gengenbach et al.^[40] attributed their observations of ageing in air to combined oxidation and partial reorganisation of PP-AA, PP-HA and similar films' surface layers, the latter being thermodynamically driven to reduce the density of polar groups at the outer surface. In view of the films' highly cross-linked structures, this process is slow, with a quoted characteristic time constant of ca. 50 d. The authors state that other reactions, e.g. hydrolysis of amines, are faster but less important. Figure 4 shows the kinetics of $[-\text{NH}_2]$ -decay in air to be quasi first-order, with a typical time constant, τ , of 3–4 d. This would tend to confirm Gengenbach's statement, but the proposed mechanism of hydrolysis can be debated. Foerch et al.^[1] also proposed mechanisms in the presence of H_2O molecules that led to drastic loss of N; however, as we pointed out earlier,^[25,28] such reactions are not compatible with the observations that N/C hardly decreased at all in PP-HA, PP-AA and L-PPE:N over long periods of time. Instead of simple hydrolysis, we therefore propose the following:

We assume that there are three main factors that affect the stability of plasma- or UV-polymer-like coatings, namely: (i) certain functional groups are inherently reactive, and can affect the material's hydrophilicity; (ii) the average molecular weight is dictated by a balance between chain-propagation and scission processes during deposition and (iii) the creation of free radicals and resulting intermolecular cross-linking reactions. The final film structure will mainly tend to contain tertiary carbon radicals, since these are the most stable ones: a similar situation is known to exist in the case of (^{60}Co) γ pre-irradiation, a well-known technique for oxidative modification of conventional polymers.^[44] Here, it is known that hydroperoxides and peroxides are formed, unstable bonds that are easily broken with rising temperature, leading to the creation of C–O• radicals. The literature shows that peroxides are more stable than hydroperoxides, and that the former can persist for many days at room temperature.^[45] However, beside the most stable tertiary carbon radicals, radicals on secondary carbon sites are also known to be present. When a highly cross-linked polymer is irradiated, its concentration of tertiary carbon radicals is found to be higher than in the case of a corresponding linear

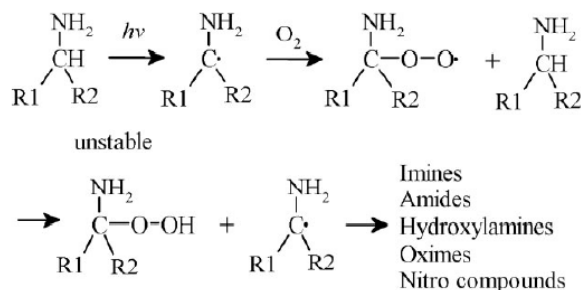
polymer. Those radicals are the reactive sites where oxygen incorporation occurs by various mechanisms when the materials are exposed to air^[46] or water (see below). In the case of the present organic deposits, oligomers, cross-links, free radicals and amine functionalities are all present to different extents that depend upon the particular R values. As we have seen, all three film-types incorporate amine groups: when a scission reaction occurs two macroradicals are formed, active sites where the incorporation of amine functionalities can occur. Therefore, one might expect a higher concentration of amines in oligomeric (lower weight) portions of the deposits than in the less soluble cross-linked portions.

It is well documented, both in earlier^[2,4,9,40] and in the present research, that substantial oxygen uptake occurs with time when plasma- or UV-based deposits are in contact with ambient air. The likely reactions that take place, based on known reaction mechanisms (some from γ -irradiation) of polymers,^[44–48] are the following:

(a) In a polymer backbone (disregarding amine functionalities):



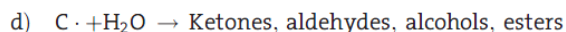
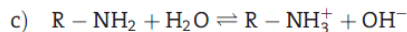
(b) In a polymer backbone, with attention to amine functionalities:



This scheme agrees with one presented by Friedrich et al.^[9] Reactions within this oxidation scheme evolve with time from the most rapid (which can produce imines, almost immediate) to much slower (nitro compounds, approximately days). Gengenbach et al.^[49] used XPS N1s binding energy shifts to show eventual conversion of amines to amides, as per scheme (b). This agrees with the data in Figure 4, but even more convincingly with our observations on air-ageing of Parylene,^[43] where each loss of an amine group is accompanied by the gain of exactly one O atom. However, unlike Gengenbach et al.,^[40,49] who found multi-step ageing kinetics in the course of their four-year investigations, we observed only single-exponential

behaviour and therefore did not extend our kinetic studies beyond about three weeks.

During immersion in Milli-Q water, reactions of the polymer-like films with water molecules (also with dissolved oxygen, according to reactions (a) and (b) above) can take place:



Reactions of types (b) and (c) are supported by high-resolution XPS (cf. Figure 11): before immersion in water, the particular film (UV-PE:N, $R=0.75$) contained primary amines (10.5 at.%), imines (1.9 at.%), amides (0.7 at.%), ketones/aldehydes (1.4 at.%) and alcohols (1.4 at.%). We recall that this deposit manifested only a small loss in thickness, so that observed changes cannot be associated with significant disappearance of oligomeric extractable solute. After immersion, we measured a concentration loss of primary amines ($\Delta[\text{NH}_2] = 25\%$), an increase of ketones/aldehydes ($\Delta[\text{C}=\text{O}] = 140\%$) and alcohols ($\Delta[\text{C}-\text{O}] = 270\%$). However, there was little or no apparent change in the concentrations of imines and amides after immersion. The loss of oligomers during immersion having been small (see above), it was obviously the cross-linked portion of the film that dominated the outcome of this analysis. Primary amines form RNH_3^+ in a reversible process (reaction (c)), the reason why they were again detected after immersion. It would therefore appear that the NH_2 groups are protected in water. When significant loss of N and of primary amines occurred, more N must have been incorporated in the oligomeric than in the cross-linked parts of the deposits.

In accord with other authors,^[9,17–21] we therefore attribute changes in thickness after immersion in aqueous media to the loss of oligomers, and possible small weight gain in the insoluble portion to oxygen-uptake. Remaining with the UV-PE:N family (cf. Figure 9), clearly, when R was increased, solubility (loss of thickness) rose. Even though the cross-linked portion is mechanically rigid, the films are nevertheless hydrophilic and they swell with time, which tends to reduce their stability.^[1] In Figure 9, $\Delta[\text{N}/\text{C}]$ and $\Delta[\text{NH}_2]$ show a lower loss of N for $R=0.75$ ($\Delta[\text{N}/\text{C}] = 17\%$ and $\Delta[\text{NH}_2/\text{C}] = 26\%$), the lowest loss of $[\text{NH}_2/\text{C}]$. The losses of N and NH_2 again suggest higher N incorporation into oligomers than within the cross-linked part.

Turning to L-PPE:N, the ($R=0.75$) sample manifested more oxygen uptake after 24 h in water than in air, which tends to confirm reactions (b) and (c). The following compares the initial composition with those after exposures to air and water, respectively: $\text{C}_{100}, \text{N}_{21}, \text{O}_5, (\text{NH}_2)_{11}$ (initial); $\text{C}_{100}, \text{N}_{20}, \text{O}_9, (\text{NH}_2)_9$ (in air) and $\text{C}_{100}, \text{N}_{16}, \text{O}_{13}, (\text{NH}_2)_4$ (in water). The chemistry of L-PPE:N is more complicated because there exist a greater variety of N functionalities

than in UV-PE:N; as in the latter case, the loss of NH_2 groups during immersion may signal their preferred incorporation in the oligomeric portion of the films. However, the other N groups present in the cross-linked part appear to be stable in water. We are diligently pursuing research aimed to answer the numerous questions raised in the course of this report. In addition, the three deposition systems are now also being used to deposit films that are rich in O-containing functionalities ($\text{OH}-$ and $\text{COOH}-$),^[50] also desirable in certain classes of bio-scientific and other applications.^[1–3,6,9]

Acknowledgements: This research is being supported by grants from the *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)*, the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ)*, the *Canadian Institutes of Health Research (CIHR)* and the *Canada Research Chairs*. MRW gratefully acknowledges support from the *Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB)* and from *Plasma Québec*. The authors are grateful to *Drs. Florina Truica-Marasescu* and *Pierre-Luc Girard-Lauriault* for their participation and for valuable discussions, and to *Mr. Y. Drolet* for skilled technical support. We also express our thanks to *Drs. Ch. Oehr* and *B. Elkin* (*Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Stuttgart, Germany*) for having provided the Parylene coatings, work now being prepared for publication.

Received: March 25, 2010; Revised: May 12, 2010; Accepted: May 17, 2010; DOI: 10.1002/ppap.201000042

Keywords: amines; biomaterials; photo-polymers; plasma polymers; solubility

- [1] R. Foerch, Z. Zhang, W. Knoll, *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 351.
- [2] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser, *Plasma Process. Polym.* **2006**, *3*, 392.
- [3] Special issue on Plasma Medicine, *Plasma Process. Polym.* **2010**, *7*(3,4).
- [4] M. R. Wertheimer, L. Martinu, J. E. Klemberg-Sapieha, G. Czeremuszkin, *Plasma Treatment of Polymers to Improve Adhesion*, in: *Adhesion Promotion Techniques in Advanced Technologies*, K.L. Mittal, A. Pizzi, Eds., Marcel Dekker, New York 1998, pp. 139–174.
- [5] F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 3886.
- [6] H. J. Griesser, R. C. Chatelier, T. R. Gengenbach, G. Johnson, J. G. Steele, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1994**, *5*, 531.
- [7] P.-L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. Demers, P. Desjardins, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 263.
- [8] P.-L. Girard-Lauriault, P. Desjardins, W. E. S. Unger, A. Lippitz, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 631.
- [9] J. Friedrich, G. Kühn, R. Mix, A. Fritz, A. Schönhals, *J. Adhes. Sci. Technol.* **2003**, *17*, 1591.
- [10] U. Oran, S. Swaraj, A. Lippitz, W. E. S. Unger, *Plasma Process. Polym.* **2006**, *3*, 288.

- [11] A. G. Shard, J. D. Whittle, A. J. Beck, P. N. Brookes, N. A. Bullett, R. A. Talib, A. Mistry, D. Barton, S. L. McArthur, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12472.
- [12] N. A. Bullett, D. P. Bullett, F.-E. Truica-Marasescu, S. Lerouge, F. Mwale, M. R. Wertheimer, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *235*, 395.
- [13] P.-L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H. T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale, M. R. Wertheimer, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 911.
- [14] F. Mwale, P.-L. Girard-Lauriault, H. T. Wang, S. Lerouge, H. Antoniou, M. R. Wertheimer, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2639.
- [15] B. Nebe, B. Finke, F. Lüthen, C. Bergemann, K. Schröder, J. Rychly, K. Liefeth, A. Ohl, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 447.
- [16] J. G. Steele, B. A. Dalton, G. Johnson, P. A. Underwood, *Biomaterials* **1995**, *16*, 1057.
- [17] Z. Zhang, Q. Chen, W. Knoll, R. Foerch, *Surf. Coat. Technol.* **2003**, *174–175*, 588.
- [18] K. Vasilev, L. Britcher, A. Casanal, H. J. Griesser, *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 10915.
- [19] A. Tarasova, P. Hamilton-Brown, T. Gengenbach, H. J. Griesser, L. Meagher, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 175.
- [20] L. Denis, D. Cossement, T. Godfroid, F. Renaux, C. Bittencourt, R. Snyders, M. Hecq, *Plasma Process. Polym.* **2009**, *6*, 199.
- [21] B. Finke, K. Schröder, A. Ohl, *Plasma Process. Polym.* **2009**, *6*, S70.
- [22] D. Hegemann, M.-M. Hossain, *Plasma Process. Polym.* **2005**, *2*, 554.
- [23] M.-M. Hossain, A. S. Herrmann, D. Hegemann, *Plasma Process. Polym.* **2007**, *4*, 135.
- [24] D. Hegemann, M.-M. Hossain, E. Körner, D. J. Balazs, *Plasma Process. Polym.* **2007**, *4*, 229.
- [25] F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 44.
- [26] F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 1043; Erratum: **2008**, *209*, 2061.
- [27] C. S. -Bournet, N. Gherardi, H. Glénat, G. Laroche, F. Massines, *Plasma Chem. Plasma Process.* DOI: 10.1007/s11090-010-9214-y.
- [28] F. Truica-Marasescu, P.-L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W. E. S. Unger, M. R. Wertheimer, *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 7406.
- [29] S. Lerouge, A. Major, P.-L. Girard-Lauriault, M.-A. Raymond, P. Laplante, G. Soulez, F. Mwale, M. R. Wertheimer, M.-J. Hébert, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1209.
- [30] P. Favia, M. V. Stendardo, R. d'Agostino, *Plasma Polym.* **1996**, *1*, 91.
- [31] Y. H. Cheng, Y. P. Wu, J. G. Chen, X. L. Qiao, C. S. Xie, B. K. Tay, S. P. Lau, X. Shi, *Surf. Coat. Technol.* **2000**, *135*, 27.
- [32] P. Hammer, F. Alvarez, *Thin Solid Films* **2001**, *398–399*, 116.
- [33] L. Detomaso, R. Gristina, G. S. Senesi, R. d'Agostino, P. Favia, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3831.
- [34] R. Serra, M. L. Zheludkevich, M. G. S. Ferreira, *Plasma Process. Polym.* **2006**, *3*, 618.
- [35] "Low Temperature Plasmas: Fundamentals, Technologies, Techniques, R. Hippler, H. Kersten, M. Schmidt, K. H. Schoenbach, Eds., 2nd edition, Wiley-VCH, Berlin 2008.
- [36] J. H. Petropoulos, *Polymer Membranes*, Springer, New York 1985.
- [37] A. Gigout, S. Levasseur, P.-L. Girard-Lauriault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicœur, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 979.
- [38] C. Boucher, J. C. Ruiz, M. Thibault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicœur, Y. Durocher, G. De Crescenzo, *Biomaterials*, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.072.
- [39] C. Girardeaux, M. Zammattéo, M. Art, B. Guillon, J. J. Pireaux, R. Caudano, *Plasma Polym.* **1996**, *1*, 327.
- [40] T. R. Gengenbach, Z. R. Vasic, S. Li, R. C. Chatelier, H. J. Griesser, *Plasma Polym.* **1997**, *2*, 91.
- [41] J. Lahann, D. Klee, H. Höcker, *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 441.
- [42] J. Miwa, Y. Suzuki, N. Kasagi, *J. Microelectromech. Syst.* **2008**, *17*, 611.
- [43] A. St.-Georges-Robillard, J. C. Ruiz, A. Petit, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, M. R. Wertheimer (in preparation).
- [44] J.-C. Ruiz, G. Burillo, E. Bucio, *Macromol. Mater. Eng.* **2007**, *292*, 1176.
- [45] H. Gu, J. Wu, H. D. Doan, *Chem. Eng. Technol.* **2009**, *32*, 726.
- [46] U. Oran, S. Swaraj, J. Friedrich, W. E. S. Unger, *Plasma Process. Polym.* **2004**, *1*, 134.
- [47] I. Retzko, J. Friedrich, A. Lippitz, W. E. S. Unger, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **2001**, *121*, 111.
- [48] P. Berger, N. Karpel, V. Leitner, M. Dore, B. Legube, *Water Res.* **1999**, *33*, 433.
- [49] T. R. Gengenbach, R. C. Chatelier, H. J. Griesser, *Surf. Interface Anal.* **1996**, *24*, 271.
- [50] J.-C. Ruiz, P.-L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, M. R. Wertheimer, *Rad. Phys. Chem.* **2010**, *79*, 310.

ANNEXE 2

AMINE-RICH ORGANIC THIN FILMS FOR CELL CULTURE: POSSIBLE ELECTROSTATIC EFFECTS IN CELL-SURFACE INTERACTIONS

M. R. Wertheimer, A. St-Georges-Robillard, S. Lerouge, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, W. Wirges et R. Gerhard, "Amine-Rich Organic Thin Films for Cell Culture: Possible Electrostatic Effects in Cell–Surface Interactions," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 51, no. 11, 2012.

Amine-Rich Organic Thin Films for Cell Culture: Possible Electrostatic Effects in Cell–Surface Interactions

Michael R. Wertheimer¹, Amélie St-Georges-Robillard¹, Sophie Lerouge², Fackson Mwale³, Bentsian Elkin⁴, Christian Oehr⁴, Werner Wirges⁵, and Reimund Gerhard⁵

¹Department of Engineering Physics, École Polytechnique, Montreal, QC, H3C 3A7, Canada

²Department of Mechanical Engineering, École de Technologie Supérieure, and Centre de recherche du CHUM, Montreal, QC, H2L 2W5, Canada

³Division of Orthopaedic Surgery, McGill University, and Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, QC, H3T 1E2, Canada

⁴Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, 70569 Stuttgart, Germany

⁵Applied Condensed Matter Physics, University of Potsdam, 14476 Potsdam-Golm, Germany

Received June 3, 2012; accepted July 18, 2012; published online November 20, 2012

In recent communications from these laboratories, we observed that amine-rich thin organic layers are very efficient surfaces for the adhesion of mammalian cells. We prepare such deposits by plasma polymerization at low pressure, atmospheric pressure, or by vacuum-ultraviolet photopolymerization. More recently, we have also investigated a commercially available material, Parylene diX AM. In this article we first briefly introduce literature relating to electrostatic interactions between cells, proteins, and charged surfaces. We then present certain selected cell-response results that pertain to applications in orthopedic and cardiovascular medicine: we discuss the influence of surface properties on the observed behaviors of two particular cell lines, human U937 monocytes, and Chinese hamster ovary cells. Particular emphasis is placed on possible electrostatic attractive forces due to positively charged R-NH₃⁺ groups and negatively charged proteins and cells, respectively. Experiments carried out with electrets, polymers with high positive or negative surface potentials are added for comparison.

© 2012 The Japan Society of Applied Physics

1. Introduction

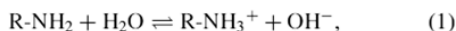
In the well-known textbook *Biomaterials Science*,¹⁾ three main methods are listed for immobilizing bio-molecules: (i) physical adsorption, (ii) physical “entrapment”, and (iii) covalent attachment. The first of these includes van der Waals and electrostatic sub-categories, while the last includes one labeled “solid surfaces”. Clearly, there can be situations where sub-sets of these can coexist, for example electrostatic attraction of a charged bio-molecule (or even a living cell) to an oppositely-charged surface: a conducting electrode or a polarized insulator, an electret. In this article, we deal specifically with such situations.

This is by no means a “new” field; in the first edition of Sessler’s book, *Electrets*,²⁾ (1980), chapter 6 by Mascarenhas bears the title “Bioelectrets: Electrets in Biomaterials and Biopolymers”. Its reference list comprises 52 citations, including Eguchi’s classical 1925 paper in *Philos. Mag.*, and several from the 1940s and 50s by other distinguished contributors to electret science. Mascarenhas alludes to the fact that blood platelets are electrically charged, and that a key problem of blood-compatible synthetic materials must be the avoidance of thrombus formation. This is a severe problem in the case of small-diameter synthetic blood vessels, for example those made of expanded poly(tetrafluoroethylene), ePTFE. Bowlin and coworkers^{3,4)} described a technique for transplanting human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), a cell-type that forms a non-thrombogenic barrier between blood and the polymer, onto the inner surface of 4 mm interior-diameter ePTFE grafts: they used a cylindrical capacitor to induce a positive luminal surface charge that attracted and adhered HUVECs from a cell-suspension inside the lumen. They found good cellular retention when the ePTFE grafts were exposed to physiologic shear stress. Another approach to avoid thrombus formation is by way of heparinization: As early as 1969, Hollahan and coworkers⁵⁾ reported grafting heparin to polymer surfaces that had been enriched with primary amine

groups by NH₃ plasma treatment; as shown below, this too may be related to electrostatic interaction between cells bearing (negative) charges and the oppositely-charged surface. Korean workers⁶⁾ recently ascribed heightened production of red blood cells in suspension to electrostatic interactions with aminated culture plates, while Rosenhahn *et al.*⁷⁾ reported enhanced settlement and adhesion strength of green alga spores on PTFE films that had been charged to high positive potential (*ca.* +3 kV). Similar electrets, from the laboratory of present co-authors (R.G. and W.W.), have been used in work described in this present article. Makohliso *et al.*⁸⁾ also used highly-charged fluoropolymer electrets to investigate adhering murine neuroblastoma cells, and they reported high levels of neurite outgrowth from substrates charged to +1000 V. Yet another unambiguous illustration of electrostatics in biology can be found in a paper by Naujoks and Stemmer,⁹⁾ who used an atomic force microscopy (AFM) tip to create sub- μ m charge patterns of either polarity on a flat poly(methyl methacrylate) (PMMA) surface. They found that water droplets stabilized by biotin-modified immunoglobulin G molecules (IgG-biotin) were attracted to the positive charge patterns due to Coulomb forces, as anticipated for the negatively-charged protein molecules.

Since the time of Hollahan’s work, cited above, the field related to plasma-based generation of reactive surfaces for immobilizing bio-molecules and/or cell colonization has grown immensely, and it has been the object of recent reviews.¹⁰⁾ Our own research group has been active in this particular area of *plasma medicine* for more than 10 years. The approach pursued here and in other laboratories worldwide is to deposit so-called plasma polymers that are rich in specific types of chemical functionalities.¹⁰⁾ Because it is unnecessary to enter into much detail here, we refer the reader to the literature, including some of our own recent articles.^{10–15)} Our particular approach for promoting cell-adhesion is to deposit such thin polymer-like organic layers that are rich in primary amine groups (R-NH₂) by using

low- or atmospheric pressure discharges (that we call L- and H-PPE:N, respectively) and by UV-photochemistry (UV-PE:N).^{11–15} By way of the following reaction:



these are known to bear positive charges when immersed in aqueous media (including bio-fluids) at physiological pH values, near 7.4. Therefore (the mostly negatively-) charged bio-molecules and living cells will be attracted to this (positively-) charged coated polymer surface. Another important example, albeit highly undesirable adhesion of living cells on immersed surfaces, is the case involving pathogenic microbes, which leads to so-called bio-films. However, there are at least two factors that severely complicate the over-simplified picture presented so far, namely the following:

- (i) Practically immediately after a solid surface is immersed into a bio-fluid or serum, that surface becomes covered with adsorbed glyco-proteins from the fluid. Living cells interact with the surface-proteins through integrin receptors in the cell-membrane.
- (ii) Even in the absence of (i), the electrostatic interactions between (+ve) surface charges and (the generally –ve) cell-charges will be modified by the fact that bio-fluids are electrolytes; this results in the formation of double layers that screen the electrostatic potential and greatly reduce the net attractive force. For the case of microbial adhesion, the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory that underlies these various concepts was the object of a thorough review several years ago.¹⁶

In the next section we describe some of our relevant experimental procedures. Following this, we present two intriguing examples of mammalian cell-adhesion experienced in these laboratories, relating to human U937 monocytes and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, respectively, which led us to ask the question whether such adhesion may possibly be dominated by electrostatics.

2. Experimental Methodology

The procedures we have used in this work for generating surfaces by plasma- or vacuum-ultraviolet (VUV)-assisted polymerization (PE:N) have been described in detail in earlier articles and therefore need not be repeated here;^{11–15} the same also applies for the case of Parylene diX AM films.¹⁵ Likewise, the rationale and methodology for cell-culture of U937 monocytes has been extensively discussed in our earlier articles.^{11,13,15} Regarding the second cell-type examined here, the reader is referred to a paper by Gigout *et al.*,¹⁷ in which the authors describe how the CHO cells were suspended in a bioreactor to produce a protein of pharmaceutical interest, tissue plasminogen activator (t-PA), used in the treatment of heart attacks and strokes. A somewhat different aspect of plasma techniques employed in these laboratories, to which reference will be made further below, is surface modification (also called “functionalization”) of polymers, in the present instance poly(ethylene terephthalate), PET. In recent work by Boucher and coworkers, thin commercial PET films were exposed to low-pressure ammonia (NH₃) plasma in order to graft amine groups to that polymer’s surface,¹⁸ as was done by

Hollahan.⁵ The functionalization procedure was preferred over deposition of PE:N, even though the yield of R-NH₂ groups was *a priori* known to be significantly lower.

An aspect of the present work that does, however, deserve a few detailed comments in this experimental section is related to electrets; results are concentrated in §3.2 below. Samples were cut from 25- and 50-μm-thick PTFE films, acquired from Dalau GmbH and from PTFE Spezialvertrieb GmbH, respectively. The samples were charged by means of a positive or negative point-to-plane corona discharge in air with a control grid for limiting, homogenizing and controlling the surface potential of the PTFE electret samples. The high voltage at the corona tip was ±15 kV and the grid voltage was ±3 kV.^{19–21} A schematic diagram of the corona-charging and surface-potential measuring setup is found in Fig. 1 of ref. 22 where a slightly different version for the poling of non-linear optical polymers is shown. The PTFE films had an area of 6 × 6 cm². In order to obtain high space-charge densities, the samples were charged for durations between 15 and 45 min at 195 °C, then cooled to room temperature under the electric field. After charging, the surface potential was measured with a bipolar Trek 314 electrostatic voltmeter in air. Surface potentials of approximately ±3 kV were detected. These measurements were reconfirmed in Montreal, albeit with another type of electrostatic voltmeter, namely an “Isoprobe”, model 170, with a model 1015 FB vibrating electrode probe (Monroe Instruments). The space-charge distribution inside the sample was measured by means of a piezoelectrically generated pressure-step (PPS) experiment,^{20,23} as previously also described in the article by Rosenhahn *et al.*⁷ The positively charged samples showed charge densities between 60 and 90 C·m^{–3} for the 25-μm-thick PTFE films, and *ca.* 40 C·m^{–3} for the 50-μm-thick ones. The 25-μm-thick negatively charged electrets exhibited 40 to 70 C·m^{–3}, and *ca.* 20 C·m^{–3} for the 50-μm-thick samples.

3. Results and Discussion

3.1 Human U937 monocytes

Human U937 monocytes, a blood-borne white cell type, are known not to adhere to most surfaces, not even to commercial tissue-culture polystyrene (TCPS) dishes. However, in a recent article¹³ we have shown that they can be made to adhere to our plasma- or photo-chemically synthesized organic thin PE:N films, provided that the outer surfaces of these coatings contain a minimum (“critical”) concentration of 4.2 at. % of primary amine groups, R-NH₂. This is illustrated in Fig. 1(a), where cells are seen to adhere only on small islands of H-PPE:N, but not on the biaxially-oriented polypropylene (BOPP) substrate, onto which the 30 μm islands had been deposited using a mask.¹¹ In Fig. 1(b) we note that different PE:N surfaces have widely-varying values of “critical” *total* nitrogen concentrations, [N]_{crit}, but the above-cited near-identical primary amine concentrations, [NH₂]_{crit}. Since then, we have also examined a commercial coating, Parylene diX AM, aminomethyl-2-2-paracyclophane, and have found it to possess similar characteristics.¹⁵ In view of what is presented in the Introduction, one might speculate that attachment here may either be (i) purely “chemical” in nature, or (ii) dictated by a primarily physical (electrostatic) effect. The fact that the

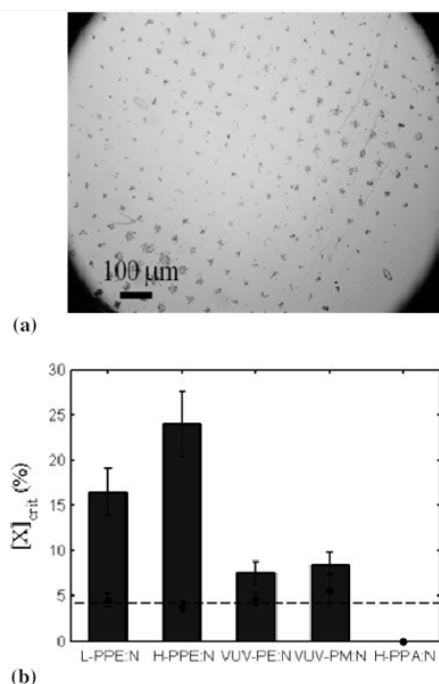


Fig. 1. (Color online) (a) Adhesion of U-937 on H-PPE:N islands with $[\text{NH}_2] > [\text{NH}_2]_{\text{crit}}$. After ref. 11. (b) Quantification of $[\text{N}]_{\text{crit}}$ in the adhesion experiments involving U937 cells. The “critical” nitrogen content, $[\text{N}]_{\text{crit}}$, required to stimulate adhesion of U937 monocytes to various substrates, namely: L-PPE:N, H-PPE:N, VUV-PE:N, VUV-PM:N, and H-PPA:N, are shown in histogram-form. For each one of these coatings, the corresponding critical amino-group content, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ (●), is superimposed. The average value of $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ is presented as a dashed, horizontal line. In the case of H-PPA:N, no adhesion of U937 was observed under any circumstances, in spite of high $[\text{N}]$ values. After ref. 13.

chemically (and morphologically) very dissimilar coatings listed above all possess precisely the same “critical” concentration value, $[\text{NH}_2]_{\text{crit}} = 4.2 \text{ at. \%}$, lends some credence to hypothesis (ii).

As already pointed out in the Introduction, numerous investigators unambiguously demonstrated the ability of charged polymer surfaces to bind proteins^{5,9)} or living cells^{3,4,7,8)} *in vitro*, and adhesion was generally found to be superior on the positively-charged ones. Because all those authors ascribed their observations to electrostatic interactions, the question arose as to the magnitude the (+ve) surface potential on our PE:N and Parylene samples. It can readily be shown that $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$ corresponds to a surface density of $5.3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$; if all surface-amines were to undergo reaction (1), the corresponding charge density would be $\sigma = 8.5 \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$, but clearly, this oversimplifies the case here, where we are dealing with weakly electrolytic cell-culture media. For the case of fluoropolymer electrets initially charged to +500 V, then immersed in media, Makohliso *et al.*⁸⁾ found that the surface charge first decayed quite rapidly, but then attained a relatively stable value of $10 \text{ nC} \cdot \text{cm}^{-2}$ which did not vary during the course of further experiments. Like those authors, we used the Monroe Isoprobe instrument to measure surface potentials, V , of our PE:N and parylene samples, after humidifying them

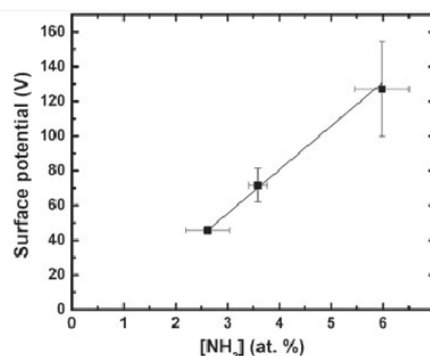


Fig. 2. Surface potential of Parylene diX AM after different periods of aging (i.e., reduced content of $[\text{NH}_2]$), as measured with the “Isoprobe” after humidifying the surface. After ref. 15.

with a fine mist of (deionized) water droplets. While in the case of PE:N (+ve) values of V were found to be relatively small (typically +40 V for L-PPE:N), Parylene diX AM displayed a more interesting behavior: as we have recently reported,¹⁵⁾ amines undergo oxidative ageing to form amides when samples are exposed to ambient air. We therefore examined both pristine Parylene, as well as samples that had been aged in air for different durations, but for which we know the concentration of amines, $[\text{NH}_2]$, from chemical derivatization experiments.¹⁵⁾ Fig. 2, the results of those experiments, shows a clear (linear) correlation between measured V and $[\text{NH}_2]$ values.

Now, unlike PE:N surfaces, Parylene substrates did manifest some adhesion of U937 cells when amine concentrations were below $[\text{NH}_2]_{\text{crit}}$. This is illustrated in Figs. 3(a)–3(c) for values of 6.0, 3.5, and 2.5 at. % of $[\text{NH}_2]$, respectively. Figure 3(d) portrays the normalized cell-density values (the near-confluent case shown in A being taken as “100%”), plotted against corresponding V values taken from Fig. 2. As expected, the surface density of adhering U937 cells is seen to have dropped with decreasing V . This would support an electrostatic adhesion mechanism for the case of the monocyte cell line on Parylene, even though the cell density was not directly proportional to V .

Clearly, U937 cell-adhesion on PE:N and on Parylene seem to be subject to quite different mechanisms, even though both film-types are smooth, ultra-thin organic coatings with comparable chemistries. The latter consideration is particularly true in the case of UV-PE:N, where 80% of the bound nitrogen is in the form of R-NH₂ functionality (versus 100% in the case of pristine Parylene diX AM). The only known difference that may possibly play a role could be the high concentration of trapped free radicals in the case of the former coatings family, but absent from the latter.¹⁵⁾

Contrary to the findings of Rosenhahn *et al.*⁷⁾ for the case of alga spores, we found only very minimal adhesion of U937 monocytes to (PTFE) electret surfaces, under experimental conditions where the surface was the highly hydrophobic Teflon itself. For the case of CHO adhesion experiments, discussed in §3.2 below, this led us to examine a “sandwich”-structured substrate configuration, one that combines hydrophilic surface properties with the high surface potential afforded by the electrets.

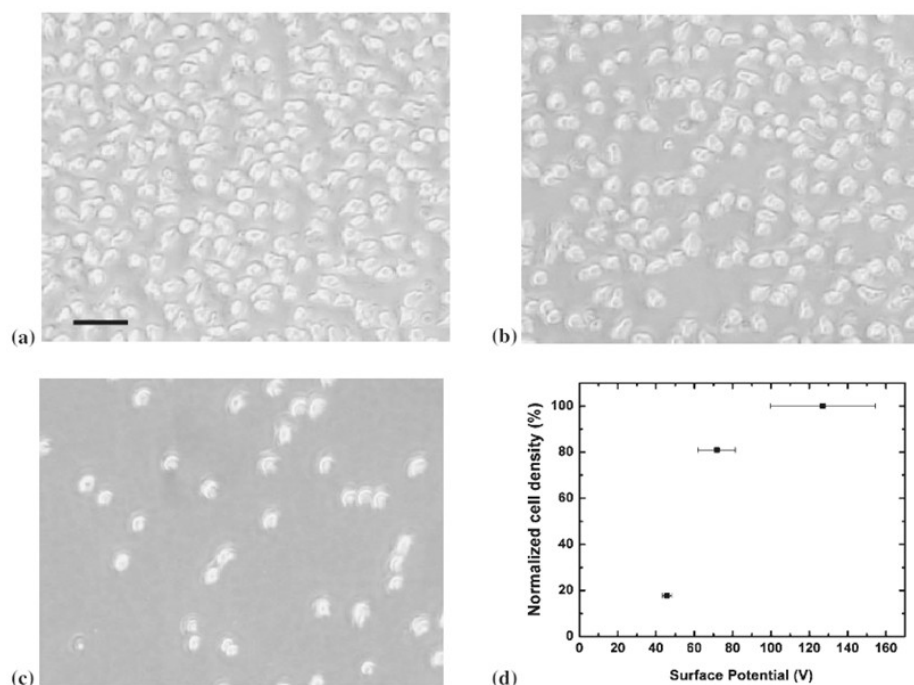


Fig. 3. Decrease in the adhesion of U937 cells on Parylene surfaces with a decrease in $[\text{NH}_2]$ because of aging. U937 cells were applied on 1 cm^2 of Parylene surfaces and incubated for 1 h in a CO_2 incubator at 37°C , on the pristine surface ((a) $[\text{NH}_2] \sim 6.0 \text{ at. \%}$), after 6 days ((b) $[\text{NH}_2] \sim 3.5 \text{ at. \%}$), and 10 days ((c) $[\text{NH}_2] \sim 2.5 \text{ at. \%}$) of aging, resulting from exposure to atmospheric air in the dark. Surfaces were then gently washed with medium and pictures were taken. Note the decrease in cell adhesion with decreasing $[\text{NH}_2]$ resulting from the aging in laboratory air. (d): Cell density of U937 on Parylene as a function of primary amine concentration, corresponding to (a), (b), and (c) above; values are normalized with respect to pristine Parylene ($\equiv 100\%$), image (a). Scale bar: $10 \mu\text{m}$. After ref. 15.

The reason for the different U937 adhesion behaviors of PE:N and Parylene described in this section is far from clear at this present moment, but resolution of this question remains challenging and intriguing.

3.2 Chinese hamster ovary cells

We have also examined a Chinese hamster ovary (CHO) cell-line. Under the particular conditions of use, this non-adhering mammalian cell-type displays a remarkable tendency to adhere to H-PPE:N particles (small flakes) in suspension: after one day, more than 95% of cells were found to be adhering to the particles' surfaces.¹⁷⁾ This cell adhesion on PE:N particles in suspension did not appear to be integrin-mediated and was such as to promote extreme levels of aggregation of the viable cells also at later stages,¹⁷⁾ all observations that suggested possible electrostatic adhesion and cohesion.

This led us to experiment with highly charged electrets of both polarities, but this time with a superimposed thin "hydrophilic" polymer surface, as illustrated in Fig. 4. The rationale here has been the following: PTFE, the electret material, is of course characterized by its extremely hydrophobic, non-wetting surface. But cells greatly prefer to adhere to wettable, hydrophilic surfaces. This latter property, hydrophilicity, can in principle be acquired by PTFE, for example by low-pressure plasma surface-modification in an ammonia (NH_3) discharge.¹⁸⁾ However, if a PTFE electret were to be immersed in gas and the pressure reduced, gas-

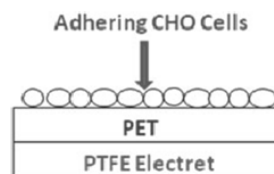


Fig. 4. Schematic arrangement for assessing CHO cell adhesion in the presence of a strong electric field (E) provided by \pm -charged electret foils.

breakdown would occur when the Paschen curve is traversed.²⁴⁾ The electret would thereby lose most, if not all, of its trapped charge and high surface potential. To avoid this, we placed $25\text{-}\mu\text{m}$ -thin, NH_3 -plasma-modified PET films on top of the electrets, in intimate contact with the latter, as illustrated in Fig. 4. This arrangement clearly satisfies both of the desired characteristics for cell-adhesion, namely wettability and high surface potential.

Figure 5 shows the results of those experiments: 1 ml of CHO cell suspension (at $10^5 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$) were left to adhere for 48 h in humidified air with $5\% \text{ CO}_2$ at 37°C , on 1 cm^2 squares of different electrets placed in a 24-well plate. The adhering cells were stained for easier visibility with crystal violet, then counted on photographs taken with an optical microscope. From left to right, the heights of the histogram's bars present the numbers of cells adhering to non-tissue-culture PS, and to untreated and NH_3 -plasma-modified PET film, respectively. The next three bars on the right refer to

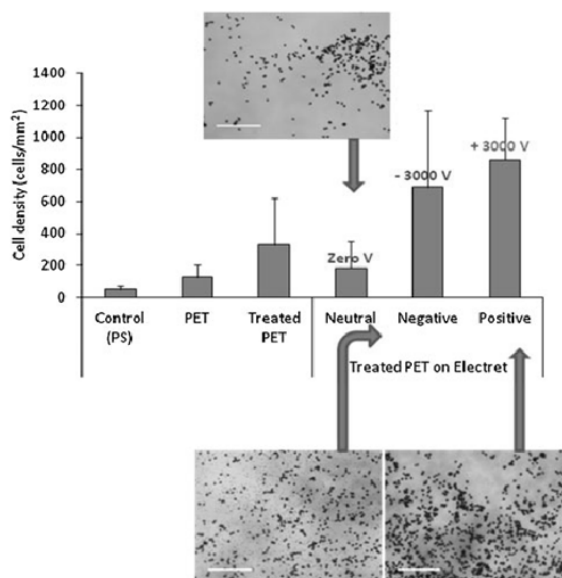


Fig. 5. (Color online) CHO cell adhesion on various charged and uncharged surfaces. CHO cells were pipetted on 1 cm² of the different sandwich electrets and incubated for 48 h in a CO₂ incubator at 37 °C. Surfaces were then gently washed with medium and pictures were taken after crystal violet staining. Scale bar, 250 μm.

the “neutral” sandwich (uncharged PTFE), followed by the sandwich structures of Fig. 4 based on negatively- and positively-charged PTFE electret foils (−3000 and +3000 V), respectively. Inspecting Fig. 5, we note little difference in CHO adhesion among the first four items on the left, except perhaps a slightly stronger trend to adhere to the aminated PET ([NH₂] ~ 1.3%).^{5,18} In contrast, there exists a clear preference for CHO cells to adhere in the presence of strong electrical potentials, with a statistically significant bias in favor of adhesion on the positively-charged material. This agrees other workers’ observations,^{3,6–8} and it would confirm that both “wettability” and elevated electrostatic potential are favored in certain cases.

4. Conclusions

There exists a significant body of published literature, some going back several decades, that points to electrostatic (i.e., *physical*) adhesive forces between biomaterials surfaces and living cells, as opposed to *chemical* ones. Nevertheless, in view of the inherent complexity of biological phenomena, including cell biology, it is rarely simple to be able to separate them unambiguously, as we hope to have illustrated here.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support for this research from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). We are also indebted to Atefeh Ghorbaniaghdam for assistance in some of the experiments, and to Afra Hajizadeh for helpful discussions.

- 1) B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons: *Biomaterials Science* (Elsevier, Amsterdam, 2004) 2nd ed., p. 227.
- 2) G. M. Sessler: *Electrets* (Springer, Berlin, 1980).
- 3) G. L. Bowlin, S. E. Rittgers, A. Milsted, and S. P. Schmidt: *J. Vasc. Surg.* **27** (1998) 504.
- 4) G. L. Bowlin and S. E. Rittgers: U.S. Patent 5714359 (1998).
- 5) J. R. Hollahan, B. B. Stafford, R. D. Falb, and S. T. Payne: *J. Appl. Polym. Sci.* **13** (1969) 807.
- 6) E. J. Baek, J. You, M. S. Kim, S. Y. Lee, S. J. Cho, E. Kim, and H. O. Kim: *Tissue Eng. C* **16** (2010) 1325.
- 7) A. Rosenhahn, J. A. Finlay, M. E. Pettit, A. Ward, W. Wirges, R. Gerhard, M. E. Callow, M. Grunze, and J. A. Callow: *Biointerphases* **4** (2009) 7.
- 8) S. A. Makohliso, R. F. Valentini, and P. Aebischer: *J. Biomed. Mater. Res.* **27** (1993) 1075.
- 9) N. Naujoks and A. Stemmer: *Colloids Surf. A* **249** (2004) 69.
- 10) K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, and H. J. Grieser: *Plasma Processes Polym.* **3** (2006) 392.
- 11) P. L. Girard-Lauriault, F. Mwale, M. Iordanova, C. N. Demers, P. Desjardins, and M. R. Wertheimer: *Plasma Processes Polym.* **2** (2005) 263.
- 12) F. Truica-Marasescu, P. L. Girard-Lauriault, A. Lippitz, W. E. S. Unger, and M. R. Wertheimer: *Thin Solid Films* **516** (2008) 7406.
- 13) P. L. Girard-Lauriault, F. Truica-Marasescu, A. Petit, H. T. Wang, P. Desjardins, J. Antoniou, F. Mwale, and M. R. Wertheimer: *Macromol. Biosci.* **9** (2009) 911.
- 14) J. C. Ruiz, A. St-Georges-Robillard, C. Thérèse, S. Lerouge, and M. R. Wertheimer: *Plasma Processes Polym.* **7** (2010) 737.
- 15) A. St-Georges-Robillard, J. C. Ruiz, A. Petit, H. T. Wang, F. Mwale, B. Elkin, C. Oehr, S. Lerouge, and M. R. Wertheimer: *Plasma Processes Polym.* **9** (2012) 243.
- 16) M. Hermansson: *Colloids Surf. B* **14** (1999) 105.
- 17) A. Gigout, S. Levasseur, P. L. Girard-Lauriault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, and M. Jolicoeur: *Macromol. Biosci.* **9** (2009) 979.
- 18) C. Boucher, J. C. Ruiz, M. Thibault, M. D. Buschmann, M. R. Wertheimer, M. Jolicoeur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo: *Biomaterials* **31** (2010) 7021.
- 19) G. M. Sessler: *Electrets* (Laplacian Press, Morgan Hill, CA, 1998) 3rd ed., Vol. 1.
- 20) R. Gerhard-Mulhaupt, W. K nstler, G. Eberle, W. Eisenmenger, and G. M. Yang: High space-charge densities in the bulk of fluoropolymer electrets detected with piezoelectrically generated pressure steps in: *Space Charge in Solid Dielectrics* (Dielectrics Society, Leicester, U.K., 1998) p. 123.
- 21) R. Gerhard-Mulhaupt: *Electrets* (Laplacian Press, Morgan Hill, CA, 1999) 3rd ed., Vol. 2.
- 22) W. Ren, S. Bauer, S. Yilmaz, W. Wirges, and R. Gerhard-Mulhaupt: *J. Appl. Phys.* **75** (1994) 7211.
- 23) W. Eisenmenger and M. Haardt: *Solid State Commun.* **41** (1982) 917.
- 24) H. J. Wintle: *J. Acoust. Soc. Am.* **53** (1973) 1578.